

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM**

MARCOS VINÍCIUS BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO
PACLITAXEL: ASPECTOS FARMACOTÉCNICOS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO***

**DIAMANTINA - MG
2014**

MARCOS VINÍCIUS BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO
PACLITAXEL: ASPECTOS FARMACOTÉCNICOS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Amaral Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Dutra de Carvalho Júnior

**DIAMANTINA - MG
2014**

Ficha catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886

B238d 2014	<p>Barbosa, Marcos Vinícius.</p> <p>Desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis contendo paclitaxel: aspectos farmacotécnicos e avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> / Marcos Vinícius Barbosa. – Diamantina, 2014.</p> <p>83 p. : il.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Eliana Amaral Leite. Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Dutra de Carvalho Júnior.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.</p> <p>1. Espectrofotometria derivada. 2. Paclitaxel. 3. Lipossomas. 4. Folato. 5. Câncer. I. Eliana Amaral Leite. II. Álvaro Dutra de Carvalho Júnior. III. Título.</p> <p>CDD 615.4</p>
---------------	---

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO
PACLITAXEL: ASPECTOS FARMACOTÉCNICOS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO***

MARCOS VINÍCIUS BARBOSA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências, nível de
Mestrado, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 25/04/2014

Profa. Dra. Ana Paula Rodrigues – UFVJM

Profa. Dra. Cristiane dos Santos Giuberti – UFES

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite – UFMG
Presidente

DIAMANTINA

2014

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof^a Dr^a Mônica Cristina de Oliveira

Departamento de Produtos Farmacêuticos, UFMG

Prof^a. Dr^a. Andréa Renata Malagutti

Departamento de Farmácia, UFVJM

Prof^a. Dr^a. Helen Rodrigues Martins

Departamento de Farmácia, UFVJM

Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Departamento de Farmácia, UFVJM

Dr. José Mário Carneiro Vilela

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC-MG

Dr^a. Margareth Spangler de Andrade

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC-MG

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS (Campinas, SP)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marcos e Irene, por todo apoio, amor e dedicação. A essência da minha vida!

Dedico também a toda minha família, em especial minha irmã Tatiane por todo afeto, carinho e orações.

“Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira. Mas já tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum”.

Monteiro Lobato

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por cada amanhecer, me proporcionado força pra vencer, coragem e determinação pra seguir em frente. Ao senhor toda honra e glória!

Aos meus pais, Marcos e Irene, por todo amor, carinho, zelo e por fazer dos meus sonhos os seus. Minha inspiração, minha essência e vida. A cada passo que dou sei que estão ao meu lado. Obrigado por tudo!

A todos os meus familiares, em especial minha irmã Tatiaine. Obrigado pela torcida, orações e por muitas vezes entenderem a minha ausência. Minha maior riqueza!

À professora Elaine, minha orientadora, obrigado pela oportunidade e por acreditar em meu trabalho. Agradeço cada incentivo, cada esforço feito para a realização desse trabalho, pela confiança, atenção e paciência. Sinto-me privilegiado em ter trabalhado com uma profissional tão competente, dedicada, justa e serena. Agradeço imensamente todos os ensinamentos transmitidos, com todo certeza me proporcionaram crescimento tanto profissional como pessoal. Peço a Deus que a abençoe e guie em todos os momentos de sua vida! Muito obrigado!

Ao professor Álvaro, meu co-orientador, agradeço por cada dica, pelas importantes conversas e ensinamentos no decorrer desse trabalho e durante toda a graduação, me despertando o interesse pela tecnologia farmacêutica.

À professora Andréa, pela disponibilização do uso do espectro e auxílio nas análises. Muito obrigado por toda gentileza e carinho dispensados durante a montagem do método analítico.

Ao professor Guilherme, agradeço por toda atenção, sugestões e paciência. Sou muito grato pelo aprendizado com cultivo e experimentação com células. Seus ensinamentos permitiram a construção e execução de cada experimento biológico desse trabalho.

À Margareth Spangler pela receptividade no Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) e disponibilidade dos equipamentos para realização das análises de microscopia de força atômica. Em especial, agradeço ao Vilela pela execução das análises de AFM, pelas conversas, sugestões e ensinamentos que tanto contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Mônica Cristina de Oliveira da UFMG pela colaboração em vários momentos desse trabalho.

À professora Helen pelo fornecimento da linhagem celular L929 e toda estrutura para cultivo e ensaio dos experimentos biológicos.

A todos os alunos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG pela receptividade, em especial a Nicolý e Liziane. Lizi, obrigado por todo carinho e todo auxílio no desenvolvimento das formulações. Palavras de agradecimento são poucas diante da enorme contribuição que você teve nesse trabalho. Agradeço a Deus por ter colocado uma pessoa tão meiga em meu caminho, sempre com um sorriso no rosto e ternura se dispondo em ajudar.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo companheirismo e aprendizado. Em especial aos alunos da primeira turma.

Aos meus queridos amigos: Cláudio, Barbhara (Bira), Débora, Fernanda (De Fátima) João Gabriel, Mônica e Náthale. Obrigado pela amizade, companheirismo, as diversões, as festas “na laje”, conversar na baiuca, aventuras nas cachoeiras, almoços de final de semana, as surpresas de aniversário.... São 7 anos na companhia de vocês, os mais loucos, divertidos e felizes da minha vida. Sentirei muitas saudades!!!

“Um amigo não racha apenas a gasolina: racha lembranças, crises de choro, experiências. Racha a culpa, racha segredos... Um amigo não empresta apenas a prancha. Emprasta o verbo, emprasta o ombro, emprasta o tempo, o calor e a jaqueta.... Uma amigo não recomenda apenas um disco. Recomenda cautela, recomenda emprego, recomenda um país... Uma amigo não dá carona apenas pra festa. Te leva pro mundo dele, e topa conhecer o teu... Uma amigo não passa apenas cola. Passa contigo um aperto, passa junto o réveillon... Uma amigo não caminha apenas no shopping. Anda em silêncio na dor, entra contigo em campo, sai do fracasso ao teu lado... Uma amigo não segura a barra, apenas. Segura a mão, a ausência, segura uma confissão, segura o tranco, o palavrão, segura o elevador.... Duas dúzias de amigos assim ninguém tem. Se tiver um, amém!” (Martha Medeiros).

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por toda contribuição na nossa formação e ensinamentos.

Agradeço em especial as professoras Tania e Helen por despertar em mim o interesse pela pesquisa científica. Orgulho-me por ter trabalhado com pessoas tão especiais como vocês durante a graduação.

Aos funcionários da PRPPG, Secretaria do Departamento de Farmácia e todos os outros da UFVJM.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela disponibilidade e análises por SAXS.

A Quiral Química do Brasil S/A pela disponibilização do Paclitaxel.

À FAPEMIG e CNPq pelo auxílio dispensado para o desenvolvimento desse projeto.

À Rede NANOBIOMG pelo apoio financeiro.

À CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

O paclitaxel (PTX) é um agente quimioterápico usado no tratamento de vários tipos de tumores sólidos como câncer de próstata, mama e ovário. Devido a sua baixa solubilidade aquosa, o PTX (Taxol®) é formulado em um veículo constituído por Cremophor EL® e álcool desidratado. No entanto, reações de hipersensibilidade aguda, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, além de problemas de instabilidade físico-química têm sido relatados com o uso do Taxol®. Diante disso, o objetivo desse estudo foi desenvolver um novo sistema lipossomal multifuncionalizado para veicular o PTX e avaliar a citotoxicidade em linhagens tumorais de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Inicialmente foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação do PTX por espectrofotometria derivada no ultravioleta. O método apresentou linearidade adequada e permitiu a quantificação do PTX na formulação com adequada precisão, exatidão e especificidade. As formulações propostas foram compostas por dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), hemisuccinato de colestera (CHEMS), e diestearoilfosfatidiletanolamina associado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀); ou por fosfatidilcolina de soja (SPC), DOPE, CHEMS e DSPE-PEG e preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico. A influência da composição lipídica qualitativa e quantitativa (10 e 20 mM) e da concentração do PTX (0,5; 1,0 ou 20 mg/mL) nas características físico-químicas dos lipossomas foi avaliada. Uma redução no teor de encapsulação foi verificada na formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG a medida que a concentração de PTX foi aumentada ($p < 0,05$), relação que não foi observada para a formulação com SPC. A associação com o PTX promoveu aumento significativo no diâmetro médio das vesículas em comparação com a formulação sem PTX e o aumento na concentração do fármaco também levou a um aumento no diâmetro. O potencial zeta de todas as formulações apresentou valores próximos da neutralidade. Essa preparação apresentou boa estabilidade, com manutenção do diâmetro médio, teor de encapsulação e potencial zeta durante 100 dias de armazenamento. Modificações da organização supramolecular da DOPE indicativas de mudanças de fase lamelar para não-lamelar em função da redução do pH foram observadas nas preparações compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG. A inclusão da SPC na bicamada, alterou a pH-sensibilidade do sistema e maior retenção do PTX foi observada em pH mais ácido quando comparada à formulação sem a SPC ($p < 0,05$). A análise morfológica demonstrou a existência de partículas esféricas regulares com diâmetros heterogêneos para as formulações contendo ou não PTX. A atividade citotóxica *in vitro* mostrou que o PTX associado aos lipossomas com folato (LpHSF-PTX) foi mais ativo que o

PTX encapsulado nos lipossomas sem associação ao folato (LpHS-PTX) e que o PTX livre. Em suma, esses resultados sugerem que os LpHSF-PTX representam uma alternativa promissora para entrega intracelular do PTX no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Espectrofotometria derivada, paclitaxel, lipossomas, folato, câncer, pH-sensibilidade.

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX) is a chemotherapeutic agent used in the treatment against various solid tumors such as prostate cancer, breast and epithelial ovarian carcinoma. Due to its low aqueous solubility, PTX is prepared in a vehicle composed of Cremophor EL[®] and dehydrated ethanol (Taxol[®]). However, acute hypersensitivity reactions, nephrotoxicity and neurotoxicity, as well as problems of physical-chemical instability have been reported with use of Taxol[®]. Thus, the purpose of this study was to develop a multifunctional liposomal system to carrier PTX, and to evaluate its cytotoxicity in tumor cell lines breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231). Firstly, an analytical method for quantification of PTX by derivative ultraviolet spectrophotometry was developed and validated. The method showed adequate linearity and allowed the quantification of PTX formulation with adequate precision, accuracy and sensitivity. The proposed formulations were composed by dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) and distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol 2000 (DSPE-PEG) or soy phosphatidylcholine (SPC), DOPE, CHEMS and DSPE-PEG and prepared by lipid film hydration method. The influence of the qualitative and quantitative lipid composition (10 and 20mM), and the PTX concentration (0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL) on the physicochemical characteristics of liposomes was evaluated. A decrease in the encapsulation percentage was observed in formulation composed DOPE:CHEMS:DSPE-PEG as the PTX concentration was increased ($p < 0,05$), however, this relation was not observed for formulations with SPC. The PTX association caused a significant increase in the mean diameter of the vesicle compared to the formulation without PTX and the increase in drug concentration also led to an increase in mean diameter. The zeta potential for all formulations showed values near neutrality. This preparation showed good stability, maintaining the average diameter, encapsulating percentage and zeta potential over 100 days of storage. Alterations in the supramolecular organization of DOPE indicative of changes in lamellar to non-lamellar phase due to pH reduction in formulation made up DOPE:CHEMS:DSPE-PEG could be observed. The inclusion of SPC in the bilayer decreased the pH sensitivity of this system and increased of PTX retention in more acidic pH was observed as compared to the formulation without SPC ($p < 0,05$). Morphological analysis evidenced the existence of regular spherical vesicles with heterogeneous diameters in formulations with and without PTX. The *in vitro* cytotoxicity assay showed the PTX associated with liposomes folate-targeted (LpHSF-PTX) was more active in PTX encapsulated than in non-targeted liposomes (LpHS-PTX) and PTX free. These

results suggest that the LpHSF-PTX represent a promising alternative for intracellular PTX delivery in the treatment of breast cancer.

Keywords: Derivative spectrophotometry, paclitaxel, liposomes, folate-targeted, cancer, pH-sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do sistema vascular de um tecido normal (esquerda) e um tumor sólido (direita). Em vermelho, está representado o sangue arterial oxigenado. Em azul está representado o sangue venoso pobre em oxigenação. Em verde estão representados os vasos linfáticos (Adaptado de TREDAN et al., 2007).	32
FIGURA 2 - Representação esquemática mostrando o aumento da permeabilidade e retenção de macromoléculas no espaço intersticial da região tumoral por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (Adaptado de SAWANT; TORCHILIN, 2012).....	33
FIGURA 3 - Estrutura química do PTX.....	35
FIGURA 4 - Mecanismo de ação do PTX. Formação, estrutura e estabilização dos microtúbulos por meio da ligação com o PTX (DE SOUZA, 2004).....	37
FIGURA 5 - Representação esquemática da formação e estrutura dos lipossomas a partir de moléculas lipídicas em solução aquosa, evidenciando a cavidade aquosa no interior dos lipossomas e a bicamada lipídica (Adaptado de BALAZN; GODBEY, 2011).....	42
FIGURA 6 - (A) Estruturas químicas do dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e hemisuccinato de colesterila (CHEMS). (B) Mudanças de fase desencadeadas por alterações no pH, em lipossomas pH-sensíveis compostos por DOPE e CHEMS. Evidenciando que, à exposição ao pH ácido, as moléculas de CHEMS sofrem protonação, promovendo a desestabilização dos lipossomas (fase lamelar), formando as micelas invertidas (fase hexagonal invertida (H_{II})). (Adaptado de FERREIRA et al., 2013).....	47

FIGURA 7 - (A) Esquema de configuração de um microscópio de força atômica. O sistema de cantilever-sonda determina a resolução e a qualidade das imagens obtidas. (B) Sistema cantilever – ponta típica de uma sonda usada em AFM (Adaptado de SITTERBERG et al., 2010).....	56
FIGURA 8 - Representação esquemática das moléculas de DOPE organizadas na fase hexagonal (H_{II}) e na fase lamelar (L) segundo TURNER e GRUNER, 1992.....	59
FIGURA 9 - Espectro de absorção de ordem zero obtido na região do ultravioleta (200 a 400 nm) para uma solução do PTX 15 $\mu\text{g/mL}$ e lipossomas brancos (LpHS) em metanol.....	73
FIGURA 10 - Espectro de absorção de primeira derivada obtido para uma solução do PTX 15 $\mu\text{g/mL}$ e dos (LpHS) em metanol, utilizando $\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$ e fator de escala 1. A seta com o comprimento de onda indica o ponto de anulação para os componentes dos lipossomas.....	74
FIGURA 11 - Espectro de absorção de primeira derivada obtido para uma solução do PTX 15 $\mu\text{g/mL}$ e dos lipossomas brancos (LpHS) em metanol, utilizando fator de escala 1 e $\Delta\lambda = 4 \text{ nm}$ (A) e $\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$ (B).....	75
FIGURA 12 - Representação gráfica da curva analítica para doseamento do PTX obtida pelo método ED-UV, com a equação da reta, o valor do coeficiente de determinação linear (r^2) e valor de correlação linear (r). Os valores de $dA/d\lambda_{246 \text{ nm}}$ foram expressos em módulo.....	77
FIGURA 13 – Etapas de Preparação dos Lipossomas: (A) Remoção do clorofórmio por evaporador rotativo sob pressão reduzida. (B) Formação do filme lipídico. (C) Hidratação do filme lipídico. (D) Calibração do tamanho das vesículas por sonicação (Fonte: Próprio Autor).....	90
FIGURA 14 – Processo de preparo das amostras dos lipossomas utilizadas nas análises por SAXS.....	92

FIGURA 15 – Estrutura química da Fosfatidilcolina de soja (SPC) (AVANTI, 2014). Disponível em < http://avantilipids.com/ >.....	106
FIGURA 16 – Espectro de SAXS obtidos para os lipossomas DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 (preto) e 5,0 (vermelho). Os índices representados nos picos correspondem a padrões de reflexão de Bragg para fases lamelar (vermelho) e cúbica (preto).....	110
FIGURA 17 – Espectro SAXS dos lipossomas compostos por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX (vermelho e azul) e branco (preto) preparados em solução de NaCl 0,9% (p/v). Os índices representados nos picos correspondem a padrões de reflexão de Bragg para fase lamelar (vermelho).....	111
FIGURA 18 - Espectro SAXS dos lipossomas compostos por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX (vermelho e azul) e branco (preto) preparados em meio RPMI. Os índices representados nos picos correspondem a padrões de reflexão de Bragg para fase lamelar (vermelho).....	112
FIGURA 19 - Perfil de retenção do PTX (%) em diferentes valores de pH. (*)Representa diferença significativa entre as formulações considerando o mesmo pH analisado. Dioleilfosfatidiletanolamina; CHEMS: Hemisuccinato de colesterila; DSPE-PEG: diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 200; SPC: Fosfatidilcolina de soja.....	114
FIGURA 20 - Estruturas moleculares típicas de lípides e suas organizações: (A) Estrutura molecular do tipo cilindro característica dos derivados de fosfatidilcolina (PC) levando à organização lamelar. (B) Estrutura molecular do tipo cone característica dos derivados de fosfatidiletanolamina (PE) (Ex. DOPE) levando à organização hexagonal invertida (H_{II}). (C) Organização lamelar das moléculas de DOPE após estabilização na presença de CHEMS, em pH fisiológico (Adaptado de FATTAL et al., 2004).....	116

FIGURA 21 – Imagem dos lipossomas branco obtida por AFM. Em (A), imagem em altura (1,5 μm X 1,5 μm) e em (B), visão tridimensional das vesículas (1,5 μm X 1,5 μm).....	118
FIGURA 22 – Gráfico com a distribuição dos diâmetros das vesículas da formulação de lipossomas branco obtidos por AFM.....	119
FIGURA 23 – Imagem de altura (A) e perfil topográfico (B) de lipossomas branco obtidos por AFM.....	119
FIGURA 24 – Imagem dos lipossomas contendo PTX obtida por AFM. Em (A), imagem em amplitude (1,0 μm X 1,0 μm) e em (B), visão tridimensional das vesículas (1,5 μm X 1,5 μm).....	120
FIGURA 25 - Gráfico com a distribuição dos diâmetros das vesículas da formulação de lipossomas contendo PTX obtidos por AFM.....	121
FIGURA 26 – Imagem de altura (A) e perfil topográfico (B) de lipossomas contendo PTX obtidos por AFM.....	121
FIGURA 27 – Modelo esquemático de lipossomas adsorvidos na superfície da mica, antes e após o contato com a sonda (Adaptado de NAKANO et al., 2008).....	122
FIGURA 28 – Perfil de retenção do PTX durante o período de armazenamento de 150 dias. (*) Representam diferença significativa em relação ao dia 0 (n = 3).....	125
FIGURA 29 – Variação do potencial zeta durante o armazenamento por 150 dias. ND = zeta não determinado para o dia 100. (n = 3).....	126
FIGURA 30 – Diâmetro médio (barra) e índice de polidispersão (ponto) durante o período de armazenamento de 150 dias. (*) Representam diferença significativa para o diâmetro médio e o índice de polidispersão em relação ao dia 0. (n = 3).....	127

FIGURA 31 – Viabilidade celular mediada pelo ensaio do MTT para PTX livre, LpHS-PTX, LpHS, LpHSF-PTX, LpHSF e LpHSF-PTX + AF em células da linhagem L929 após 48 horas de tratamento. (*) Representa diferença significativa em relação ao LpHS-PTX, LpHSF-PTX e LpHSF-PTX + AF ($p<0,001$). (°) Representam diferença significativa em relação ao LpHSF-PTX e LpHSF-PTX + AF ($p<0,001$). Dados expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as contendo PTX..... 130

FIGURA 32 – Viabilidade celular mediada pelo ensaio do MTT para PTX Livre, LpHS-PTX, LpHS, LpHSF-PTX, LpHSF e LpHSF-PTX + AF em células das linhagens tumorais MFC-7 e MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. (*) Representa diferença significativa em relação ao PTX livre ($p<0,01$) e (°) Representam diferença significativa em relação ao PTX livre ($p<0,01$), LpHS-PTX e LpHSF-PTX + AF ($p<0,05$). Dados expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as contendo PTX..... 131

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Medicamentos que usam o CrEL em sua formulação.....	38
TABELA 2 – Estudos envolvendo o emprego de lipossomas na vetorização do PTX....	50
TABELA 3 - Análise de variância dos dados de linearidade do método de doseamento do PTX por ED-UV.....	78
TABELA 4 - Determinação da precisão intra-dia e inter-dias para o método de doseamento do PTX por ED-UV.....	79
TABELA 5 - Determinação da exatidão do método de doseamento do PTX por ED-UV.....	80
TABELA 6 - Determinação da robustez do método de doseamento do PTX por ED-UV.....	81
TABELA 7 – Composição lipídica, razão molar e concentração do PTX para as formulações propostas.....	89
TABELA 8 – Condições para a padronização do tempo de sonicação necessário para a redução do tamanho dos lipossomas.....	99
TABELA 9 – Diâmetro médio, índice de polidispersão, concentração de PTX encapsulada, teor de encapsulação e potencial zeta das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 20 mM contendo ou não PTX*	101
TABELA 10 – Distribuição de tamanho das vesículas das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 20 mM contendo ou não PTX*	103

TABELA 11 – Diâmetro médio, índice de polidispersão, concentração de PTX encapsulada, teor de encapsulação e potencial zeta das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 10 mM contendo ou não PTX*	104
TABELA 12 – Distribuição de tamanho das vesículas das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 10 mM contendo ou não PTX*	105
TABELA 13 – Diâmetro médio, índice de polidispersão, concentração de PTX encapsulada, teor de encapsulação e potencial zeta das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE- PEG e DOPE:CHEMS:DSPE-PEG-folato na concentração lipídica total de 10 mM e 0,5 mg/mL de PTX*.....	124
TABELA 14 – Valores de IC50 calculados para as linhagens de células tumorais e normais*.....	132
TABELA 15 – Índice de seletividade calculado para as linhagens de células tumorais*.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\lambda$	Variação do comprimento de onda
AF	Ácido fólico
AFM	Microscopia de força atômica
ANOVA	Análise de variância
CHEMS	Hemisuccinato de colessterila
Chol	Colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMD	Concentração média determinada
CrEL	Cremophor EL [®]
$dA/d\lambda$	Primeira derivada
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
DMPC	Dimiristoilfosfatitilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DP	Desvio padrão
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPR	Desvio padrão relativo
DSPE-PEG	Diestearoilfosfatidiletanolamina associada a polietilenoglicol

DSPE-PEG-folato	Diestearoilfosfatidiletanolamina associada a polietilenoglicol 2000 e ao folato
ED-UV	Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta
EDXD	Difração de raios-X dispersiva de energia
EPR	Efeito de permeação e retenção aumentado
H _{II}	Fase hexagonal invertida
HSPC	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
IC ₅₀	Concentração de PTX necessária para promover 50% de inibição da viabilidade
ICH	Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano
IS	Índice de Seletividade
LD	Limite de quantificação
LpHS	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada sem PTX
LpHSF	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada recoberto com folato sem PTX
LpHS-PTX	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo PTX
LpHSF-PTX	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada recoberto com folato contendo PTX
LQ	Limite de Quantificação
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares
MTT	Brometo de 3-(4,3-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

OMS	Organização Mundial da Saúde
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol 2000
pH _e	pH extracelular
pH _i	pH intracelular
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PTX	Paclitaxel
S ₁₀₀ PC	Fosfatidilcolina de soja 100%
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SPC	Fosfatidilcolina de soja
SUV	Vesículas unilamelar pequenas
T _c	Temperatura de transição de fase
TE	Teor de encapsulação
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO.....	27
REVISÃO DA LITERATURA	30
1.1 Câncer.....	30
1.2 Tratamentos do Câncer.....	34
1.3 Paclitaxel.....	34
1.4 Sistemas Nanoestruturados para Vetorização de Fármacos.....	40
1.5 Lipossomas.....	41
1.5.1 Composição e Generalidades.....	41
1.5.2 Lipossomas Convencionais e de Circulação Prolongada.....	43
1.5.3 Lipossomas pH-sensíveis.....	45
1.5.4 Lipossomas Sítio-específico ou de Superfície Modificada.....	48
1.6 Paclitaxel em Sistemas Lipossomais.....	49
1.7 Caracterização Físico e Físico-Química dos Lipossomas.....	52
1.7.1 Diâmetro Médio das Vesículas Lipossomais.....	53
1.7.2 Potencial Zeta.....	53
1.7.3 Taxa de Encapsulação.....	54
1.7.4 Análise Morfológica.....	55
1.7.5 Caracterização da Organização Supramolecular dos Lipossomas por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo.....	57
OBJETIVOS.....	62
Objetivo Geral.....	62
Objetivos Específicos.....	62
CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO A ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PARA DOSEAMENTO DO PACLITAXEL.....	63
1 INTRODUÇÃO.....	64

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Materiais.....	67
2.1.1 Reagentes.....	67
2.1.2 Equipamentos e condições de análise.....	67
2.2 Métodos.....	68
2.2.1 Especificidade.....	68
2.2.2 Linearidade.....	68
2.2.3 Precisão.....	69
2.2.4 Exatidão.....	69
2.2.5 Robustez.....	70
2.2.6 Limites de Detecção e Quantificação.....	70
2.2.7 Análise Estatística.....	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1 Especificidade.....	72
3.2 Linearidade.....	76
3.3 Precisão.....	78
3.4 Exatidão.....	79
3.5 Robustez.....	80
3.6 Limites de Detecção e Quantificação.....	81
4 CONCLUSÃO.....	83
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS CONTENDO PACLITAXEL.....	
1 INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Materiais.....	87
2.1.1 Reagentes.....	87
2.1.2 Equipamentos.....	88
2.2 Métodos.....	88
2.2.1 Desenvolvimento Farmacotécnico das Formulações Lipossomais.....	88
2.2.2 Caracterização Físico-Química dos Lipossomas.....	90
2.2.2.1 Diâmetro Médio e Distribuição do Tamanho das Vesículas.....	90
2.2.2.2 Determinação do Potencial Zeta (ζ).....	91

2.2.2.3 Determinação do Teor de Encapsulação do PTX.....	91
2.2.3 Análise da Organização Supramolecular.....	92
2.2.4 Avaliação da pH-sensibilidade.....	93
2.2.5 Análise Morfológica.....	93
2.2.6 Estudo de Estabilidade Preliminar.....	94
2.2.7 Estudos de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	95
2.2.7.1 Cultivo das Linhagens Celulares.....	95
2.2.7.2 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio de Metabolização do Metiltiazoltetrazólico (MTT).....	95
2.2.8 Análise Estatística.....	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
3.1 Desenvolvimento Farmacotécnico das Formulações Lipossomais.....	98
3.1.1 Otimização da Etapa de Sonicação.....	98
3.1.2 Influência da Composição e Concentração Lipídica e Concentração de PTX.....	100
3.2 Análise Preliminar da Organização Supramolecular.....	109
3.3 Avaliação da pH-sensibilidade.....	114
3.4 Análise Morfológica.....	117
3.5 Estudo de Estabilidade Preliminar.....	123
3.6 Estudos de Citotoxicidade <i>in vitro</i>.....	128
4 CONCLUSÕES.....	136
5 PERSPECTIVAS.....	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
ANEXOS.....	159
Anexo A – Espectros de absorção de primeira derivada obtidos para uma solução de PTX, lipossomas brancos contendo SPC e lipossomas branco contendo DSPE- PEG-folato.....	160
Anexo B – Produção Científica Associada a essa Dissertação.....	161

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Inicialmente, o câncer foi considerado uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Porém, nas últimas décadas vem ganhando uma dimensão maior em países emergentes tornando-se um grave problema de saúde pública mundial (INCA, 2014). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta o câncer como a segunda maior causa de morte por doença no país e estima a ocorrência de aproximadamente 580 mil novos casos para o ano de 2014, válidos também para o ano de 2015, sendo as regiões sul e sudeste detentoras das maiores taxas (INCA, 2014).

A quimioterapia é a modalidade terapêutica mais requerida para o tratamento do câncer, porém, apresenta uma série de inconvenientes como os efeitos adversos comuns à maioria dos antineoplásicos, decorrente da ação inespecífica sobre as células normais e neoplásicas (ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010; DA SILVA et al., 2012). O paclitaxel (PTX) é um dos quimioterápicos mais utilizados na terapia clínica sendo direcionado contra vários tipos de tumores sólidos incluindo câncer de próstata, de cabeça e pescoço, das células não-pequenas do pulmão, carcinoma de ovário e câncer de mama (GUCHELAAR et al., 1994; ROWINSKY; DONEHOWER, 1995). Devido sua baixa solubilidade em água (0,3 a 1,0 µg/mL), esse fármaco apresenta um baixo índice terapêutico e limitações para o uso, principalmente a nível parenteral (IQBAL et al., 2011; LIU et al., 2011).

O Taxol[®] é a forma farmacêutica disponível comercialmente do PTX que consiste em uma dispersão micelar desse fármaco em uma mistura de Cremophor EL (CrEL) e álcool desidratado (HUREAUX et al., 2010; SCRIPTURE et al., 2005; GUCHELAAR et al., 1994). No entanto, essa formulação vem mostrando problemas de estabilidade, incompatibilidade com os componentes plásticos de cateteres e recipientes de armazenamento, além de diversos efeitos adversos como reações de hipersensibilidade aguda, nefrotoxicidade e neurotoxicidade em decorrência da quantidade de CrEL requerida para tal formulação (PANCHAGNULA, 1998; SCRIPTURE et al., 2005; GELDERBLOM et al., 2001).

Em razão disso, estudos vêm sendo conduzidos no intuito de elaborar sistemas transportadores alternativos para veicular o PTX. As formulações lipossomais contendo PTX vêm mostrando um alto teor de encapsulação para o fármaco e têm sido testadas com sucesso em vários experimentos *in vitro* e *in vivo*, quando comparadas com o Taxol[®], exibindo baixa

toxicidade e maior eficiência antitumoral (KOUDELKA; TURÁNEK, 2012). No entanto, a instabilidade dos sistemas ainda é um problema recorrente.

A funcionalização dos lipossomas com folato é uma forma de aumentar o direcionamento para as células neoplásicas, uma vez que as células tumorais humanas são capazes de expressar receptores de folato em quantidade bem superiores que os tecidos normais (CONEY et al., 1991). Em células do câncer de ovário e de mama, essa expressão chega a quase 90 e 43% dos casos humanos, respectivamente (PARKER et al., 2005). Por outro lado a pH-sensibilidade é uma propriedade que torna os lipossomas reativos frente a mudanças no pH do ambiente em que se encontram. Em pH fisiológico esses lipossomas são estáveis e a exposição a um ambiente ácido são capazes de sofrer desestabilização das vesículas e, conseqüentemente, há liberação do material encapsulado (SIMÕES et al., 2004; FERREIRA et al., 2013).

É sabido que, os lipossomas são potencialmente capazes de se concentrar em tecidos tumorais em função do efeito de permeação e retenção aumentados, conhecido como efeito EPR, que permite que partículas de 200 a 800 nm possam extravasar e se acumular no espaço intersticial das células tumorais (SAWANT; TORCHILIN, 2012; TORCHILIN, 2011; MAEDA et al., 2000). Desse modo, esses lipossomas, uma vez extravasados se ligam aos receptores de ácido fólico sendo posteriormente internalizados por endocitose. No interior do endossoma, em consequência do pH ácido o lipossoma é desestabilizado, liberando o PTX no citoplasma, o qual se torna disponível para atingir o sítio alvo de ação, os microtúbulos.

Nesse contexto, visando contornar o problema da insolubilidade aquosa desse fármaco, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os principais efeitos adversos associados ao uso do Taxol[®], o presente estudo teve como proposta o desenvolvimento de um novo sistema lipossomal multifuncionalizado para veiculação do PTX associando propriedades de circulação prolongada, pH-sensibilidade e direcionamento ativo mediante funcionalização com folato.

Em função da composição lipídica, pode-se esperar uma maior estabilidade do sistema e em termos terapêuticos, vislumbra-se uma redução significativa da dose administrada com menor incidência de efeitos adversos.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer

Câncer, conhecido cientificamente como neoplasia, é o termo utilizado para definir um conjunto de mais de 200 doenças que apresentam em comum um crescimento anormal e desordenado de células transformadas por mutação (ALMEIDA et al., 2005). Segundo a OMS, em 2012, foram registrados aproximadamente 14,1 milhões de novos casos dessa doença, com as maiores taxas concentradas na América do Norte, Oceania e parte da Europa. Um aumento substancial no número de novos casos é ainda previsto, podendo chegar a 19,3 milhões em 2025 (WHO, 2012).

No Brasil, dados do INCA (2014) apontam a ocorrência de aproximadamente 580 mil casos novos de câncer para o ano de 2014, válidos também para o ano de 2015. Os tipos mais incidentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e pulmão para o sexo masculino, representando 22,8 e 5,4% dos novos casos, respectivamente. Para o sexo feminino o câncer de mama, cólon e reto e colo do útero serão os mais incidentes, representando juntos, cerca de 33% dos novos casos.

A proliferação e diferenciação celular são processos essenciais aos seres vivos uma vez que, as células se organizam em tecidos para exercerem papéis específicos e vitais. Esses dois processos são regulados por fatores internos e externos, que, integrados entre si, garantem o desenvolvimento em níveis homeostáticos (BRASILEIRO-FILHO et al., 2011).

O ciclo celular de uma célula eucariota consiste em uma série de eventos regulados, composto basicamente por quatro etapas. A fase G_1 , na qual a célula encontra-se em intensa síntese de RNA e proteínas, é a etapa em que a célula está aumentada de tamanho e se preparando para a duplicação do material genético, em resposta aos fatores de crescimento e sinais internos. A fase S é a etapa em que ocorre a duplicação do DNA; G_2 é a etapa na qual a célula se prepara para realizar a mitose. Em seguida, a célula entra na etapa M onde ocorre a mitose celular. Há ainda a etapa G_0 na qual a célula, após deixar a mitose, permanece em estado de repouso por período variado (KENNY et al., 2004; BRASILEIRO-FILHO et al., 2011). Porém, e com frequência, surgem transtornos que afetam o controle desses mecanismos levando aos distúrbios de proliferação e diferenciação e, uma das consequências é o surgimento do câncer.

O câncer pode ser considerado uma doença genômica, uma vez que, as células tumorais são provenientes de células normais que sofreram mutações iniciais e levaram a formação de clones que foram acumulando outras mutações até se tornarem malignas, em um processo chamado carcinogênese (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Os genes que atuam na formação das neoplasias são principalmente os que, nas células normais, estão envolvidos no controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose, sendo eles, os genes supressores de tumores e os oncogenes (PAUWELS et al., 1998).

Os chamados genes supressores de tumores atuam nos pontos de restrições ou checagem (G_1/S e G_2/M) durante o ciclo celular, dentre eles destaca-se o gene que estimula a síntese da proteína *p53*. Os oncogenes são produtos da ativação dos proto-oncogenes que estimulam a proliferação desordenada das células tumorais (PAUWELS et al., 1998).

Assim, quando há alguma anormalidade ou alteração em um ou mais desses genes, as células deixam de se comportar dentro dos limites fisiológicos e possibilitam o surgimento das neoplasias. Essas alterações podem ser causadas por fatores hereditários e biológicos, como por exemplo, vírus, bactérias, parasitas; agentes químicos e físicos (PAUELS et al., 1998; ALMEIDA et al., 2005).

As neoplasias ou tumores podem ser classificados em duas categorias: benignos e malignos. Os tumores benignos caracterizam-se por apresentarem células bem diferenciadas com crescimento lento e expansivo, bem unidas entre si. Não promovem infiltração nos tecidos vizinhos, formam uma massa geralmente esférica sendo, na maioria das vezes, inofensivos ao organismo. Em contrapartida, os tumores malignos possuem células com redução ou perda total de diferenciação, crescimento rápido, maior resistência a hipóxia, motilidade considerável devido à menor adesividade entre si e capacidade de originar metástases, processo responsável por até 90% da mortalidade associada ao câncer (BRASILEIRO-FILHO et al., 2011; CHAFFER; WEINBERG, 2011).

Os tumores malignos sólidos são estruturas semelhantes a órgãos, porém heterogêneos, com arquitetura complexa e algumas peculiaridades em relação ao tecido normal. Com a alta taxa metabólica e de proliferação, as células neoplásicas necessitam de nutrientes para a manutenção de sua atividade. Assim, para garantir o suprimento sanguíneo adequado, induzem o desenvolvimento de uma nova rede vascular a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e/ou de células tronco endoteliais circulantes, em um processo chamado angiogênese, que contribui para o crescimento tumoral e metástase. Caso contrário, a massa tumoral não poderia crescer mais do que 1 a 2 mm de diâmetro (CHUA et al., 2010; JUN et al., 2010). Esses novos vasos são dilatados, tortuosos, com ramificações e não

possuem organização em arteríolas, capilares e vênulas, porém compartilham características de todas essas estruturas. Suas paredes podem ter fenestrações e membranas basais descontínuas ou ausentes, além de apresentarem deficiência de um sistema de vasos linfáticos (Figura 1) (TREDAN et al., 2007).

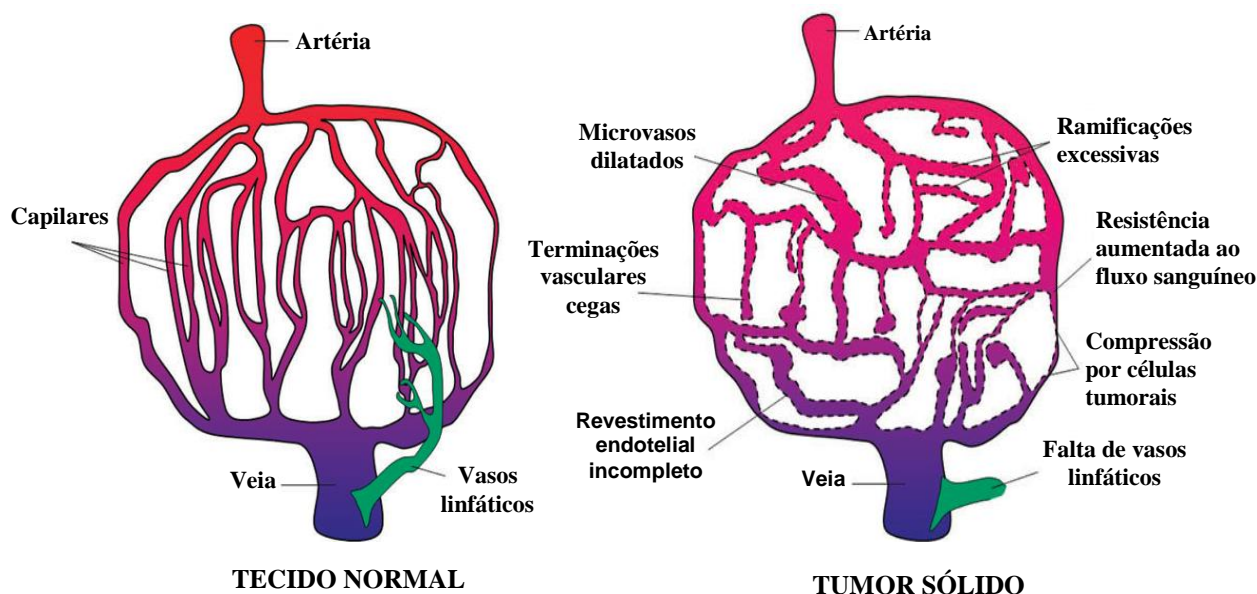


FIGURA 1 - Representação esquemática do sistema vascular de um tecido normal (esquerda) e um tumor sólido (direita). Em vermelho, está representado o sangue arterial oxigenado. Em azul está representado o sangue venoso pobre em oxigenação. Em verde estão representados os vasos linfáticos (Adaptado de TREDAN et al., 2007).

A angiogênese tumoral ocorre de forma rápida e defeituosa apresentando certas fenestrações que tornam esse endotélio vascular descontínuo e com permeabilidade aumentada a diversas moléculas (Figura 2). Os poros formados apresentam diâmetros que variam de 200 a 800 nm, permitindo que macromoléculas deixem o leito vascular acumulando-se no espaço intersticial da região tumoral. Além disso, nesse espaço há o aumento da pressão intersticial e o retardo do extravasamento das macromoléculas acumuladas, devido à ausência de drenagem por um sistema linfático adequado. Essa arquitetura vascular alterada caracteriza um processo chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentados, o efeito EPR. Todas essas alterações promovem o aumento da permeabilidade desses vasos quando comparados com os normais, mostrando certa relevância para o tratamento com agentes quimioterápicos, uma vez que, os fármacos ganham acesso aos

tumores através da circulação sanguínea (MAEDA et al., 2000; TREDAN et al., 2007; TORCHILIN, 2011; SAWANT; TORCHILIN, 2012).

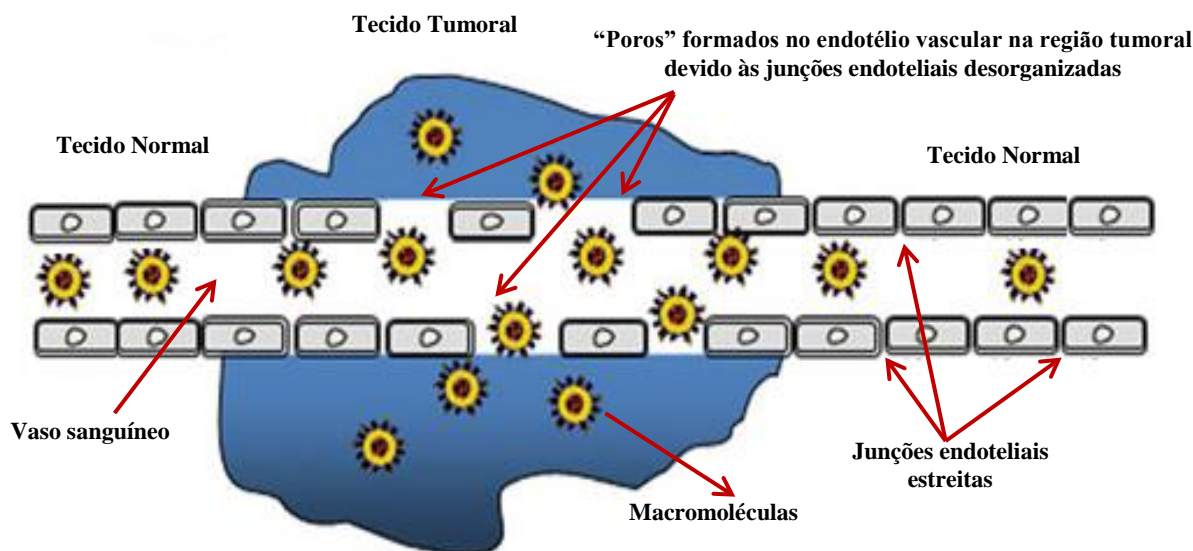


FIGURA 2 - Representação esquemática mostrando o aumento da permeabilidade e retenção de macromoléculas no espaço intersticial da região tumoral por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (Adaptado de SAWANT; TORCHILIN, 2012).

Outra característica marcante dos tecidos tumorais reside no fato do pH extracelular (pH_e) ser mais ácido que o pH do tecidos normais. O pH intracelular (pH_i) de ambos os tecidos é relativamente similar pois há a necessidade de se manter um ambiente adequado às várias atividades citoplasmáticas. Essa diferença entre o tecido normal e o tumoral pode ser explicada pela má organização das estruturas vasculares das células tumorais que resulta em um fluxo sanguíneo heterogêneo e uma entrega de nutrientes não uniformes. Dessa forma, a alta produção de energia decorrente do aumento da taxa de glicólise anaeróbia leva um aumento da produção de ácido lático nas regiões mal perfundidas, e uma vez que o fluxo sanguíneo é reduzido e insuficiente para remover o excesso de ácido lático produzido, uma redução do pH_e é detectada (FERREIRA et al., 2013).

1.2 Tratamentos do Câncer

Atualmente, as modalidades mais requeridas para o tratamento do câncer incluem a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, variando de acordo com o tipo e a gravidade da doença (SOUZA, 2004; ALMEIDA et al., 2005).

A cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor encontra-se em estágio inicial e não sofreu metástase. A radioterapia é comumente associada a outras modalidades no intuito de incrementar a eficiência do tratamento e, mesmo usada de forma isolada, pode diminuir o tamanho de tumores considerados grandes, a recorrência e sua respectiva chance de metástase (ALMEIDA et al., 2005).

Entretanto, em mais de 50% dos casos, as neoplasias se caracterizam por quadros precoces de micrometástases, necessitando de terapias de abordagens sistêmicas com o uso de agentes antineoplásicos. Esse tipo de tratamento consiste no uso de compostos químicos com o objetivo primário de destruir as células neoplásicas. Porém, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesionando tanto as células doentes quanto as saudáveis, principalmente àquelas que apresentam rápido crescimento como as células gastrintestinais, capilares e do sistema imunológico. Fato que explica a maioria dos efeitos colaterais causados ao organismo pela quimioterapia como alopecia, diarreia, náuseas, vômitos e maior suscetibilidade às infecções pela queda na imunidade (BRANDÃO et al., 2010; DA SILVA et al., 2012).

Nos últimos 50 anos, a pesquisa de novos fármacos antineoplásicos introduziu no cenário terapêutico cerca de 70 medicamentos (BRANDÃO et al., 2010). Porém, os estudos nesse campo ainda são vastos devido à necessidade de desenvolver medicamentos que apresentem elevada eficácia antitumoral e baixa toxicidade garantindo um tratamento seguro ao paciente e um índice terapêutico favorável. Dentre os quimioterápicos obtidos de produtos naturais e, atualmente, mais usados na terapêutica destacam-se os taxanos, como PTX.

1.3 Paclitaxel

O PTX foi o fármaco antineoplásico precursor da nova classe dos agentes estabilizadores dos microtúbulos, os chamados taxanos. Descoberto pelo Instituto Nacional do

Câncer dos Estados Unidos, em 1971, esse fármaco foi resultado da investigação de mais de 12.000 compostos naturais para testes de atividade contra vários tipos de tumores (ROWINSKY et al., 1992; CORRÊA, 1995; SINGLA et al., 2002).

Inicialmente, era obtido a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, o *Taxus brevifolia*, da família *Taxaceae*. Devido ao suprimento limitado dessa espécie, sua disponibilidade no mercado farmacêutico foi retardada e, a partir de meados dos anos 80, o PTX passou a ser obtido por semi-síntese de um precursor não citotóxico, a 10-desacetilbacatina-III, extraído de teixos mais abundantes, como o *Taxus baccata*, que apresenta o esqueleto básico do PTX (CORRÊA, 1995; SOUZA, 2004).

O PTX é um pseudoalcalóide diterpeno com fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (Figura 3) e quimicamente conhecido como (2 α , 5 β , 7 β , 10 β , 13 α) -4, 10- Diaceoxi -13-{[2R, 3S)- 3-(benzoil-amino)- 2-hidroxi-3-fenilpropanoil]oxi} -1,7-di-hidroxi-9-oxo-5,20-epoxi-tax-11-em-2-ilo. É altamente lipofílico e devido a indisponibilidade de grupos funcionais ionizáveis é praticamente insolúvel em água (0,3 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$), fato que contribui para sua baixa biodisponibilidade e dificuldade de manipulação em diferentes valores de pH (PANCHAGNULA, 1988; IQBAL et al., 2011; LIU et al., 2011).

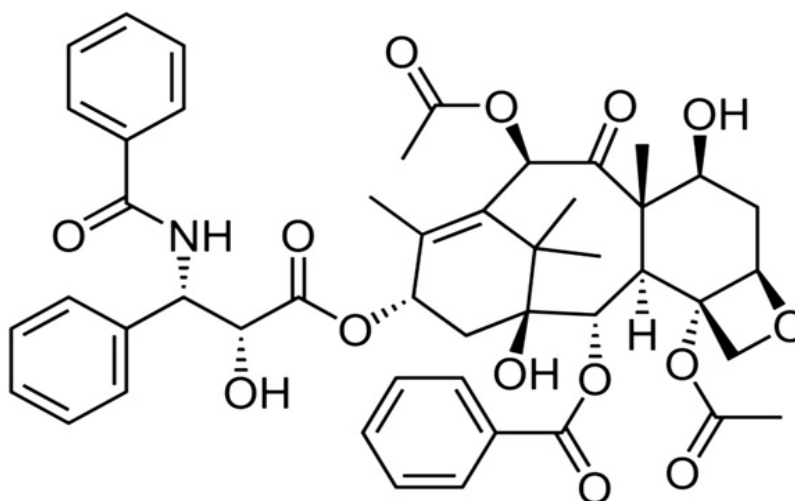


FIGURA 3 - Estrutura química do PTX.

Sua atividade antineoplásica foi comprovada contra vários tipos de tumores sólidos incluindo câncer de próstata, de cabeça e pescoço, das células não-pequenas do pulmão, carcinoma do ovário e câncer de mama, sendo os dois últimos, responsáveis por 22,9% dos

tipos de câncer mais incidentes em mulheres no território brasileiro (GUCHELAAR et al., 1994; ROWINSKY; DONEHOWER, 1995; INCA, 2014). Devido à sua eficácia, o PTX foi desenvolvido e comercializado pela companhia norte-americana Bristol-Meyer Squibb com o nome de Taxol[®], durante a década de 90, e atualmente está disponível como medicamento em mais de 60 países (SOUZA, 2004).

O mecanismo de ação do PTX está relacionado com a estabilização irreversível dos microtúbulos. Essas estruturas são formadas por proteínas heterodiméricas compostas por duas subunidades: α e β -tubulina, de aproximadamente 440 aminoácidos cada uma. A tubulina está presente em todas as células eucariotas existindo sob a forma heterodimérica $\alpha\beta$ (livre) ou microtubular. As subunidades α e β são organizadas entre si por ligações de hidrogênio, sendo a formação dos microtúbulos realizada pelo rearranjo regular em cilindros flexíveis, obtidos em duas etapas: iniciação e alongação (Figura 4) (CORRÊA, 1995; SOUZA, 2004; ZHANG et al., 2014).

Os microtúbulos estão envolvidos em diversas funções celulares como na manutenção da forma celular, transporte de organelas dentro das células, mobilidade, transdução de sinais e são essenciais ao processo de divisão celular na formação do fuso mitótico. Estruturalmente, são rearranjados em forma cilíndrica, contendo 13 protofilamentos e apresentando um diâmetro de 24 nm (Figura 4). Todo processo de iniciação e alongação ocorre na presença de proteínas associadas aos microtúbulos, Mg^{2+} e trifosfato de guanosina, sendo o processo reversível em presença de Ca^{2+} a 0°C (SOUZA, 2004; CORRÊA, 1995).

Em geral, essas estruturas não são estáticas e, depois de certo período de crescimento atingem um equilíbrio junto com a tubulina livre. Quando a concentração de tubulina livre está baixa, a polimerização espontânea não ocorre (GUCHELAAR et al., 1994; CORRÊA, 1995; SOUZA, 2004).

O PTX por sua vez associa-se aos núcleos α e β tubulinas, através de uma intercalação, mais especificamente, por ligação ao grupo N terminal do aminoácido 31 da subunidade β , tanto na presença quanto na ausência dos fatores essenciais à montagem dessas estruturas. Essa ligação resulta em um distúrbio na formação dos microtúbulos, que apresentam 12 protofilamentos e 22 nm de diâmetro, os quais são resistentes à despolimerização. Dessa forma, o ciclo celular acaba sendo bloqueado em sua última fase, isto é, na fase G₂ tardia e na fase M, o que, por sua vez, impede a divisão celular e consequentemente a proliferação das células neoplásicas (Figura 4) (GUCHELLAR et al., 1994; CORRÊA, 1995; SINGLA et al. 2002).

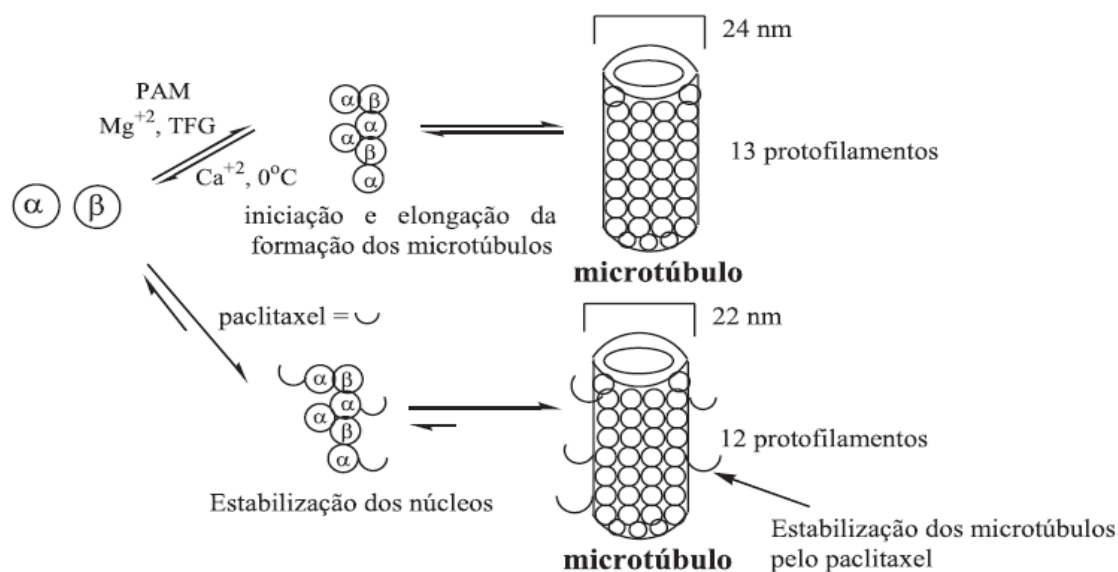


FIGURA 4 - Mecanismo de ação do PTX. Formação, estrutura e estabilização dos microtúbulos por meio da ligação com o PTX (SOUZA, 2004).

A forma farmacêutica comercialmente disponível, Taxol[®], consiste em uma dispersão micelar do PTX em uma mistura de partes iguais de etanol desidratado e do diluente CrEL, um derivado polietoxilado do óleo de castor (GUCHELAAR et al., 1994; SCRIPTURE et al., 2005; HUREAUX et al., 2010), sendo administrado por via intravenosa. Sua administração, geralmente, segue um esquema terapêutico de doses entre 135 a 145 mg/m², em infusão de 3 ou 24 horas, a cada três semanas (PANCHAGNULA, 1998). Entretanto, sua aplicação na terapêutica tem gerado vários problemas de toxicidade e efeitos adversos, principalmente devido a quantidade de CrEL requerida em sua formulação comercial.

O CrEL é utilizado para solubilizar uma ampla variedade de fármacos hidrofóbicos incluindo anestésicos, sedativos, imunossuppressores e agentes antineoplásicos. Porém, a quantidade usada na administração, considerando a dose única, varia entre 1,5 a 10 mL (Tabela 1), com exceção do PTX, cuja quantidade empregada é aproximadamente 26 mL (GELDERBLOM et al., 2001; SCRIPTURE et al., 2005).

TABELA 1 - Medicamentos que usam o CrEL em sua formulação (GELDERBLOM et al., 2001).

Agente	Classe terapêutica	Quantidade administrada ^a (mL)
Aplidina	Antineoplásico	~1,5
C8KC	Fotossensibilizador	5,5
Clanfenur	Antineoplásico	10,3
Ciclosporina A	Imunossupressor	3,5
Diazepam	Sedativo	1,5
Didemmina B	Antineoplásico	2,0
Paclitaxel	Antineoplásico	25,8
Propofol	Anestésico	~7,0
Teniposido	Antineoplásico	1,5

^aQuantidade média de CrEL administrada por paciente, considerando uma única administração de dose.

A infusão do CrEL, em quantidade relativamente alta, induz a produção de histamina e ativação de proteínas do complemento causando reação de hipersensibilidade aguda, caracterizada por dispneia, erupções cutâneas, taquicardia, angioedema e anafilaxia sistêmica que pode levar a quadros clínicos potencialmente graves como parada cardiorrespiratória e colapso cardíaco (PANCHAGNULA, 1998; SZE BENI et al., 1998; GELDERBLOM et al., 2001; MIELE et al., 2009). Estudos clínicos têm demonstrado que até 41% dos pacientes experimentaram reações de hipersensibilidade aguda (IRIZARRY et al., 2009). Em virtude disso, medidas profiláticas são adotadas durante o tratamento, com o uso combinado de anti-histamínicos e corticosteroides, anteriormente e ao longo da infusão, porém não garantem total ausência dessas reações (GELDERBLOM et al., 2001; KLOOVER et al., 2004).

Além disso, o CrEL tem a capacidade de lixiviar agentes plastificantes como o di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) das embalagens e de cateteres padrões constituídos de cloreto de polivinila (PVC). A quantidade de DEHP lixiviado depende da concentração de CrEL administrado e pode causar quadros de hepatotoxicidade grave (GELDERBLOM et al., 2001; DONAY; SEWELL, 2006).

A neuropatia periférica sensorial é a manifestação neurotóxica mais evidente em decorrência do uso do Taxol[®], com risco maior em pacientes diabéticos. Esse efeito tóxico pode ser causado por dois mecanismos. O primeiro está relacionado com a ação do PTX sobre o cone neuronal dos neurônios periféricos, inibindo seu crescimento e movimentação por meio da estabilização dos microtubulos, resultando assim em gangliopatia e anaxopatia. O segundo é dependente do CrEL, que atua através dos ácidos graxos insaturados residuais e

derivados etoxilados produzidos como resultado de sua peroxidação. Esses produtos podem afetar diretamente os neurônios e, principalmente, as células de Schwann, levando à desmielinização e degradação progressiva das células nervosas, causando neuropatia motora com a paralização e dormência dos membros, hipotensão ortostática e perda sensorial periférica (GELDERBLOM et al., 2001; MIELKE et al., 2006).

Outras reações adversas proeminentes associadas ao uso do PTX incluem mielossupressão, sob a forma de neutropenia grave, sendo recomendável ajuste de doses. Toxicidade cardíaca, com maior frequência bradicardia e casos mais raros como bloqueio da condução atrioventricular e isquemia cardíaca (GUCHELAAR et al., 1994), bem como efeitos colaterais comuns incluindo alopecia, mucosites e náuseas também são relatados.

Além dos efeitos adversos graves, o Taxol[®] apresenta sérios problemas em relação a sua estabilidade química e física. Garantir a estabilidade em longo prazo dessa formulação é um fator limitante para assegurar a eficácia e segurança do tratamento ao paciente. Antes da sua administração intravenosa, o Taxol[®] é previamente diluído em solução salina (NaCl 0,9% p/v) ou solução de dextrose 5% p/v para uma concentração final de 0,3 a 1,2 mg/mL, o que ocasiona a precipitação do fármaco, particularmente quando a concentração de PTX é superior a 0,6 mg/mL nessas preparações. Dessa forma, terapias com esquemas de infusões mais lentas ou mesmo padronização de doses necessitando diluições prévias são dificultadas devido à baixa estabilidade dessa formulação (GELDERBLOM et al., 2001; BURM, 2005).

Outra alteração notória exercida pelo CrEL foi observada no comportamento farmacocinético do PTX. Esse veículo apresenta um volume de distribuição muito pequeno e, em concentrações acima da concentração micelar crítica, o PTX tende a permanecer mais associado às micelas que associado às proteínas transportadoras ou mesmo na forma livre. Dessa forma, o PTX passa a assumir uma farmacocinética distinta com valores de depuração diminuído, substancialmente, com o aumento da dose do medicamento, em um fenômeno conhecido como farmacocinética não-linear, particularmente evidente com regimes de infusão de pelo menos 3 horas. Como resultado disso, a percentagem total de PTX associado às micelas é muito maior que o fármaco não ligado, tornando-o menos disponível para o metabolismo hepático e distribuição pelo organismo, principalmente nas regiões tumorais (SCRIPTURE et al., 2005).

Na tentativa de contornar esses inconvenientes, estudos vêm sendo conduzidos em busca de análogos mais hidrossolúveis através de modificações químicas em sua molécula e síntese de pró-fármacos (FENG et al., 2002; RYU et al., 2008; HUANG et al., 2013). Além disso, novas abordagens farmacotécnicas utilizando sistemas de liberação de fármacos têm

sido adotadas, destacando-se as ciclodextrinas (SHARMA et al., 1995; YU et al., 2013; JING et al., 2013), micelas poliméricas (ZHANG et al., 2011), nanopartículas (XU et al., 2005; ZHAO et al., 2012) e lipossomas (CROSASSO et al., 2000; YANG et al., 2007a; KOUDELKA et al., 2010).

O Abraxane[®] (ABI-007) é um exemplo de nanosistema que, atualmente, encontra-se disponível no mercado farmacêutico dos Estados Unidos. Consiste em um sistema coloidal composto de nanopartículas de albumina carreadoras do PTX. Foi aprovado em 2005 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo direcionado e eficiente para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático e de células não-pequenas do pulmão. Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que o ABI-007 foi significativamente menos tóxicos que o Taxol[®], sendo a dose máxima tolerada 1,5 a 2 vezes maior que o tratamento convencional e o volume de distribuição foi maximizado em uma extensão de 5 vezes (MIELE et al., 2009; SCRIPTURE et al., 2005).

1.4 Sistemas Nanoestruturados para Vetorização de Fármacos

Os fármacos, sistematicamente, propiciam efeitos benéficos significativos, mas também podem apresentar diversos efeitos colaterais associados ao seu uso, principalmente em relação à dose administrada, como é o caso dos antineoplásicos. Em grande parte dos estudos *in vitro*, essa classe de medicamentos mostra resultados eficazes, porém, seu uso clínico em humanos age de forma indiscriminada sobre todas as células do organismo, desencadeando efeitos deletérios. A aplicação terapêutica dessa classe de medicamentos vem tentando alcançar o equilíbrio entre a eficácia e toxicidade (KINGSLEY et al., 2006). Em alguns casos, esses problemas surgem devido à baixa solubilidade aquosa desses compostos, instabilidade em fluidos biológicos e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade, necessitando assim, de maiores doses o que pode resultar em um tratamento com riscos aumentados (RAWAT et al., 2006).

Em virtude disso, o emprego de sistemas nanoestruturados para vetorização e liberação de fármacos antineoplásicos vem crescendo e ganhando destaque no âmbito farmacêutico. São chamados assim, pois são propositalmente projetados para apresentarem diâmetros que variam em média de 10 a 1000 nm. Apresentam diferentes composições e propriedades biológicas, podendo carrear fármacos, genes e outras moléculas bioativas,

adsorvidas ou conjugadas a suas estruturas (KOO et al., 2005; MOHANRAJ; CHEN, 2006; SURI et al., 2007).

Esses sistemas oferecem vantagens quando comparados a outras formas farmacêuticas convencionais, destacando: maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada da substância; diminuição significativa da toxicidade associada ao fármaco ou mesmo dos adjuvantes da formulação convencional; menor volume de circulação e consequentemente redução das dosagens empregadas, capacidade de superar a resistência oferecida por algumas barreiras biológicas e oferecer proteção ao fármaco contra inativação química ou enzimática; além de promover direcionamento a determinados alvos (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Dentre os principais sistemas nanoestruturados estudados, os lipossomas ocupam lugar de destaque como sistema transportador, por serem biocompatíveis, não imunogênicos e versáteis estruturalmente em termos de tamanho, composição, carga superficial e fluidez de membrana, além de possibilitar a associação de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas (FRÉZARD et al., 2005; BATISTA et al., 2007; AKABARZADEH et al., 2013).

1.5 Lipossomas

1.5.1 Composição e Generalidades

Esses sistemas foram descritos pela primeira vez por Bangham e colaboradores (1965) em um trabalho de investigação acerca da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais. Ao propor um modelo de membrana biológica, foi observado que alguns lípides, em meio aquoso, se organizavam de forma espontânea em bicamadas formando vesículas esféricas que três anos mais tarde foram reconhecidos como lipossomas (Figura 5).

O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou interesse da comunidade científica para a sua aplicação na medicina e farmacologia (SANTOS; CASTANHO, 2002). Em 1971, Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, iniciando o desenvolvimento nessa área.

Basicamente, os lipossomas são constituídos por fosfolípides, podendo ser de origem natural, sintética ou semi-sintética (LASIC, 1988). Essas substâncias caracterizam-se por serem anfifílicas constituídas por uma molécula de glicerol ligada em uma das suas

extremidades a um grupo fosfato, que por sua vez, está ligado a um grupo de caráter hidrofílico como a colina, etanolamina, serina ou inositol. As hidroxilas remanescentes são esterificadas por ácidos graxos contendo de 10 a 24 átomos de carbono com zero a seis ligações duplas (NEW, 1990).

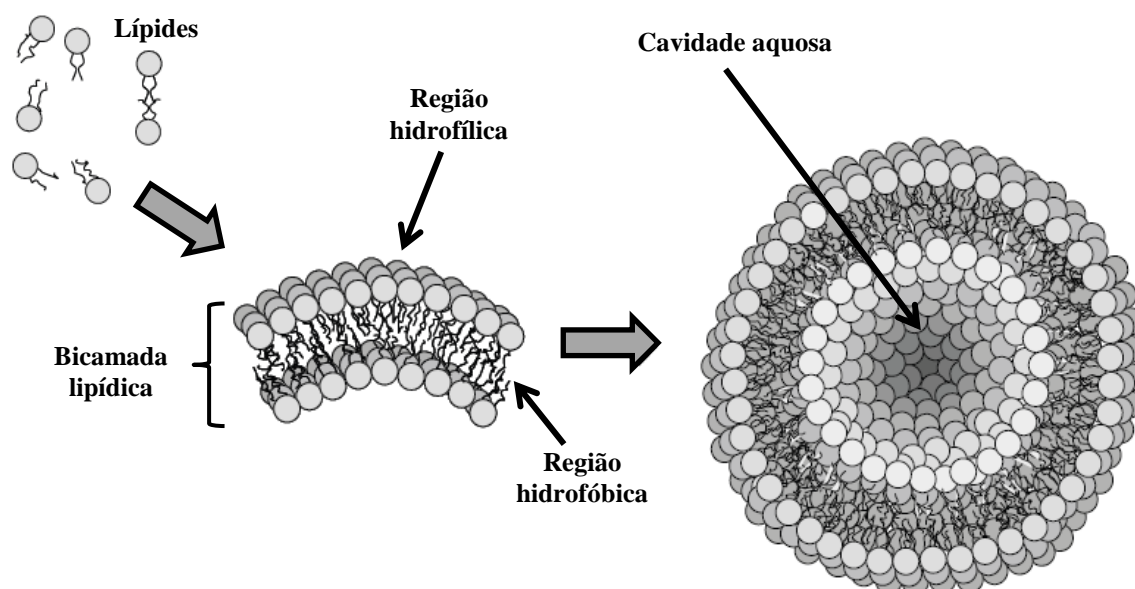


FIGURA 5 - Representação esquemática da formação e estrutura dos lipossomas a partir de moléculas lipídicas em solução aquosa, evidenciando a cavidade aquosa no interior dos lipossomas e a bicamada lipídica (Adaptado de BALAZN; GODBEY, 2011).

Os fosfolípides possuem uma propriedade intrínseca importante, a temperatura de transição de fase (T_c). Quando a temperatura do meio é igual a T_c a membrana dos lipossomas passa de uma fase gel, na qual a cadeia hidrocarbonada dos lípides encontra-se em estado ordenado, para uma fase cristal-líquido, onde suas moléculas ficam com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. Portanto, diferentes membranas compostas por lípidos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez a uma mesma temperatura (LASIC, 1998; FRÉZARD, 2005).

Os esteroides, principalmente o colesterol, são componentes importantes na maioria das membranas naturais e sua incorporação nas membranas lipossomais causa modificações importantes em suas propriedades. A presença e a orientação das moléculas de colesterol podem reduzir ou aumentar a fluidez das membranas fosfolipídicas. Na presença de fosfolípides de baixa T_c , o colesterol reduz a fluidez da membrana, enquanto para os

fosfolípidos com elevada T_c , o colesterol promove aumento na fluidez da membrana (FRÉZARD et al., 2005).

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica, sendo classificado como unilamelares de pequeno tamanho (SUV, do inglês *small unilamellar vesicle*) com diâmetro variando entre 20 a 40 nm e, quando apresentam vesículas com um diâmetro médio superior a 100 nm são denominados unilamelares de grande tamanho (LUV, do inglês *large unilamellar vesicle*). Ademais existem lipossomas que possuem bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados como multilamelares (MLV, do inglês *multilamellar vesicle*), englobando vesículas com tamanho médio de 1000 nm (LASIC, 1998; SANTOS; CASTANHO, 2002).

Durante a evolução de seu emprego como carreadores, os lipossomas sofreram algumas alterações possibilitando sua maior aplicabilidade na vetorização de fármacos a alvos específicos e diminuição da toxicidade. Dentro desse contexto, podem-se destacar os lipossomas convencionais; lipossomas de circulação prolongada; lipossomas polimórficos, como por exemplo, os lipossomas pH-sensíveis e os lipossomas sítio-específicos ou de superfície modificada.

1.5.2 Lipossomas Convencionais e de Circulação Prolongada

Inicialmente, o desenvolvimento dos sistemas lipossomais encontrou alguns obstáculos no âmbito farmacêutico e farmacológico. A baixa encapsulação de fármacos e, as instabilidades físico-química e biológica foram os principais fatores limitantes para o progresso desses sistemas como carreadores de fármacos (BATISTA et al., 2007).

A tecnologia baseada nos chamados lipossomas convencionais foi a primeira geração de lipossomas com aplicações farmacêuticas. Esses sistemas são compostos, geralmente, por fosfolípidos naturais e neutros, além da adição eventual do colesterol, que contribuiu para retardar a liberação das substâncias encapsuladas. Apesar dos avanços nesse campo, os lipossomas convencionais tiveram aplicabilidade restrita quando administrados por via sistêmica, pois eram rapidamente eliminados da circulação sanguínea. Estudos *in vivo* mostraram que esses, apesar de serem semelhantes às membranas biológicas, eram reconhecidos como corpo estranho e captados pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sendo direcionados rapidamente para tecidos ricos em suprimento de

sangue e abundância em células fagocitárias como fígado, baço e medula óssea (IMMORDINO et al., 2006; AKBARZADEH et al., 2013).

Na tentativa de contornar tal problema, alguns estudos incorporaram glicolípides à superfície da membrana lipídica visando o “escape” dos lipossomas ao reconhecimento e captação pelas células do SFM, possibilitando assim, uma permanência maior dos mesmos na circulação sanguínea. E assim, foram introduzidos os chamados lipossomas de circulação prolongada. A primeira estratégia estudada foi mediante a preparação de lipossomas mimetizando a membrana dos eritrócitos. Nesse caso, a superfície lipossomal foi modificada com componentes hidrofílicos naturais como o monossialogangliosídeo GM1 (GABIZON; PAPAHAJOPOULOS, 1988; ALLEN; CHONN, 1987). Entretanto, o processo de obtenção dessas substâncias evidenciava alguns inconvenientes como a fonte de extração, proveniente do cérebro de gado, considerada inadequada para o uso farmacêutico, além dos elevados custos do processo extrativo. Além disso, os resultados no aumento da meia-vida de circulação dos lipossomas recobertos com GM1 foram significativos apenas em modelos experimentais com ratos (IMMORDINO et al., 2006).

Outros compostos capazes de conferir maior tempo de circulação sanguínea aos lipossomas também foram investigados. Klibanov e seus colaboradores (1990) mostraram que, a incorporação de um polímero hidrofílico, o polietilenoglicol (PEG), à membrana lipossomal aumentava, com sucesso, o tempo de circulação sanguínea desse sistema. A presença de grupos volumosos hidrofílicos criados pelo PEG na superfície lipossomal resulta em um efeito estérico à ligação das opsoninas, as quais são responsáveis por sinalizar os lipossomas como corpo estranho, e impedindo assim, seu reconhecimento e captação pelas células do SFM.

A modificação da superfície dos lipossomas com PEG pode ser conseguida de várias maneiras: adsorção física sobre as vesículas; ligação covalente de grupos reativos à superfície de lipossomas previamente formulados, mas o método mais amplamente utilizado é o acoplamento desse polímero através de uma ligação cruzada com um lípide presente na composição das vesículas. Além do aumento da meia vida de circulação sanguínea dos lipossomas, o PEG mostrou evitar agregação das vesículas melhorando a estabilidade das formulações (IMMORDINO et al., 2006).

De uma maneira geral, a presença do PEG com massa molecular entre 1000 e 2000 Da, em concentrações que variam de 5 a 10% da composição dos lipossomas, é suficiente para reduzir o reconhecimento pelas células do SFM e conferir maior estabilidade a esses sistemas (ULRICH, 2002).

Um exemplo de medicamento comercialmente disponível que utiliza a tecnologia dos lipossomas de circulação prolongada é o DOXIL[®]/Caelyx[™], formulação contendo a doxorubicina, aprovada nos Estados Unidos e Europa para o tratamento do câncer no ovário e sarcoma de Kaposi (CHARROIS; ALLEN, 2003; CHARROIS; ALLEN, 2004; KO et al., 2013). Além de exibir um perfil de toxicidade melhorado em comparação com seu homólogo não lipossomal, esse medicamento mostrou uma progressão mediana na sobrevida de pacientes com câncer de ovário recorrente, quando comparado com tratamentos convencionais à base de carboplatina e PTX (PUJADE-LAURINE et al., 2010).

1.5.3 Lipossomas pH-sensíveis

Cada vez mais o foco das pesquisas em sistemas lipossomais tem sido no desenvolvimento de estratégias que proporcionem, da melhor forma possível, o aumento da capacidade de mediar a entrega de fármacos em alvos cada vez mais específicos, incluindo também, a liberação dessas substâncias a nível intracelular (BALAMURALIDHARA et al., 2011). Esses estudos têm resultado em ferramentas importantes e eficientes na terapia com fármacos e biomoléculas que exercem seus efeitos intracelularmente (FERREIRA et al., 2013). Nesse contexto, surgiram os lipossomas polimórficos que apresentam capacidade de se tornarem reativos e alterar sua estrutura frente alguma alteração, como, por exemplo, a mudança de pH (BATISTA et al., 2007). Os lipossomas pH-sensíveis, são um dos exemplos desses carreadores.

Os derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), ao contrário da maioria dos fosfolípides, possuem uma região polar pequena e pouco hidratada, que ocupa um volume menor quando comparado com sua respectiva cadeia de hidrocarbonetos, exibindo, portanto, uma organização supramolecular do tipo cônica. Essa organização favorece a formação de interações intermoleculares entre grupos amina e fosfato da região polar, o que explica a tendência dessas moléculas em adquirir a fase hexagonal invertida (H_{II}) não promovendo a formação das vesículas lipídicas. A formação de lipossomas com esses fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS) (Figura 6), os quais se encontram sob a forma ionizada em pH fisiológico. Esses estabilizantes se distribuem homogeneamente entre as moléculas de PE e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre

os grupamentos carboxílicos presentes no CHEMS e os grupos fosfatos presentes nos fosfolípidos favorece a organização lamelar e a formação das vesículas (Figura 6) (SIMÕES et al., 2004).

Em pH fisiológico esses lipossomas são estáveis, e sua exposição em meios ácidos favorece a protonação dos agentes estabilizantes, e como consequência ocorre a desestabilização das vesículas possibilitando a liberação do material carreado (OLIVEIRA et al., 2000; SIMÕES et al., 2004).

É descrito que, em média, o pH extracelular da região tumoral, situa-se entre 6,0 e 7,0, ao passo que, em tecidos normais e no sangue, esse valor é de aproximadamente 7,4. Porém, os locais de maior acidez nos tumores são frequentemente os mais distantes da microvasculatura tumoral, onde o acesso pelos lipossomas é mais dificultado (BALAMURALIDHARA et al., 2011). Além disso, o pH do interstício tumoral raramente cai abaixo de 6,5 dificultando a desestabilização dos lipossomas para liberação de seu conteúdo (FERREIRA et al., 2013).

Entretanto, ao ser internalizados na célula por endocitose, os lipossomas pH-sensíveis são mantidos nos endossomas de estágios iniciais, onde o pH encontra-se a um valor próximo de 6,5. O potencial desse sistema reside na sua capacidade de sofrer desestabilização na fase endossomal tardia, com duração de aproximadamente 10 a 15 minutos, onde o pH situa-se entre 5,0 e 6,0. Nesse ponto, ocorre a liberação do seu conteúdo no interior do citoplasma, além de evitar sua degradação a nível lisossomal (KARANTH; MURTHY, 2007; FERREIRA et al., 2013).

A liberação do conteúdo dos lipossomas ao citoplasma tem sido proposta por três mecanismos hipotéticos: em primeiro lugar a desestabilização das vesículas sensíveis ao pH tem a capacidade de desestabilizar a membrana endossômica, presumivelmente, através da formação de poro; em segunda hipótese, após a desestabilização dos lipossomas, as moléculas carreadas se difundem para o citoplasma, e por último, é proposto uma fusão entre os lipossomas e a membrana dos endossomas, proporcionando a liberação do conteúdo lipossomal (KARANTH; MURTHY, 2007).

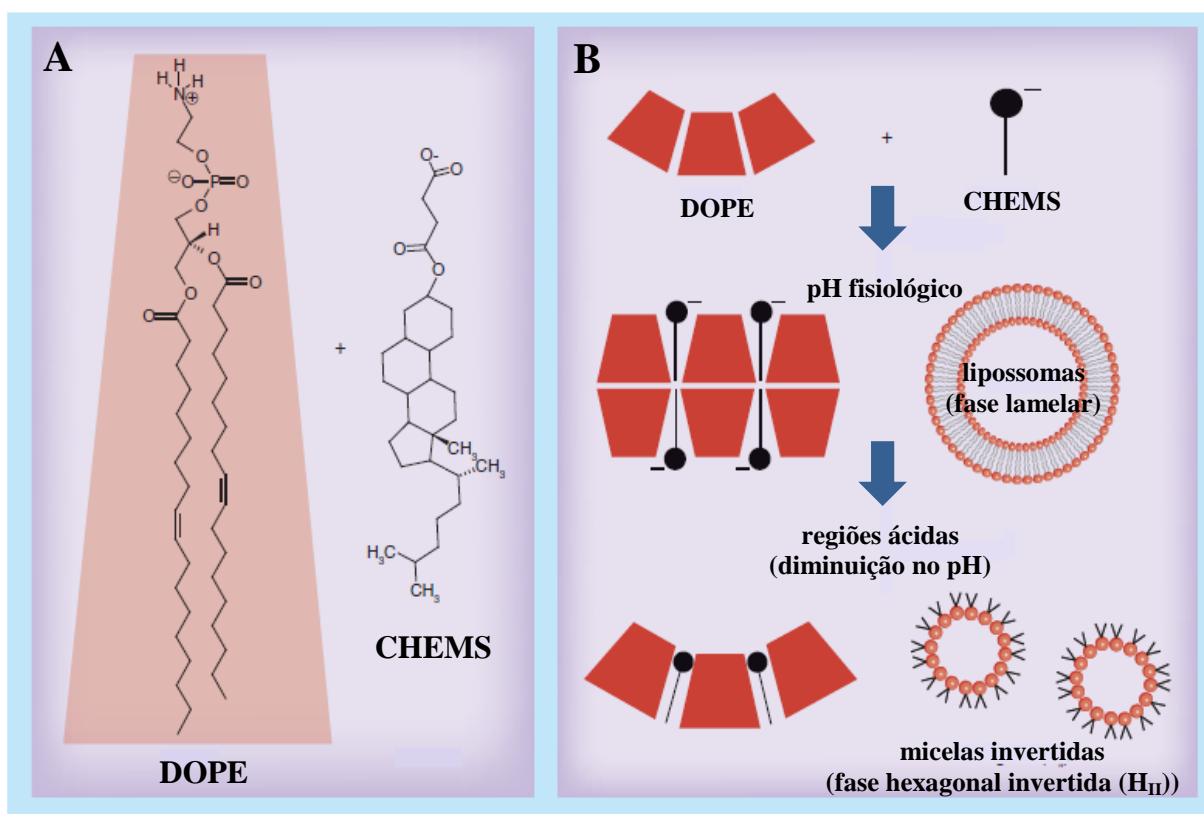


FIGURA 6 - (A) Estruturas químicas do dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e hemisuccinato de colesterila (CHEMS). (B) Mudanças de fase desencadeadas por alterações no pH, em lipossomas pH-sensíveis compostos por DOPE e CHEMS. Evidenciando que, à exposição ao pH ácido, as moléculas de CHEMS sofrem protonação, promovendo a desestabilização dos lipossomas (fase lamelar), formando as micelas invertidas (fase hexagonal invertida (H_{II})). (Adaptado de FERREIRA et al., 2013).

A combinação das propriedades dos lipossomas de circulação prolongada e pH-sensibilidade, vêm mostrando ganhos de eficácia antitumoral e redução da toxicidade associada a diversos antineoplásicos (TORCHILIN, 2005; ISHIDA et al., 2006; RANE; PRABHAKAR, 2009). Leite e colaboradores (2009, 2012b), em estudos com lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo o antineoplásico cisplatina observaram, em modelos animais, que esse sistema apresentou uma significativa redução da toxicidade, exibindo aumento na dose letal (DL_{50}) e na dose máxima tolerada de aproximadamente duas e três vezes, respectivamente, quando comparado ao tratamento com cisplatina livre. O estudo de atividade antitumoral demonstrou uma redução significativa do crescimento e volume tumoral para o tratamento com os lipossomas em confronto com a cisplatina livre (LEITE et al., 2012a).

1.5.4 Lipossomas Sítio-específico ou de Superfície Modificada

Os lipossomas podem se localizar em órgãos ou tecidos específicos de forma passiva ou ativa. A captação passiva está relacionada com elementos estruturais, fisiológicos e processos anatômicos. Na terapia do câncer, características da região tumoral, como a presença de poros no endotélio vascular, elevado fluxo sanguíneo e ausência de um sistema linfático eficiente, bem como o tamanho reduzido dos lipossomas, possibilitam o extravasamento e retenção dos mesmos na região tumoral devido ao EPR aumentado (BERTRAND et al., 2014).

Por outro lado, a captação ativa é alcançada pela utilização dos lipossomas sítio-específicos ou de superfície modificada, mediante inserção de ligantes (MEDINA et al., 2004; SURENDIRAN et al., 2008).

Esses sistemas caracterizam-se por possuir em suas superfícies ligantes que atuam reconhecendo de forma específica moléculas de superfícies ou receptores expressos em determinados locais ou células (BATISTA et al., 2007; SAWANT; TORCHILIN, 2012). Os ligantes largamente utilizados incluem peptídeos, oligossacarídeos, anticorpos, ácidos nucleicos e moléculas pequenas tais como vitaminas (BERTRAND et al., 2014).

Para a produção de lipossomas de superfície modificada, o ligante deve ser específico para a região de interesse, uma vez que a captação deve ser direcionada a um determinado órgão ou tecido. Assim, há a necessidade de procurar ligantes para os receptores ou substâncias que sejam superexpressos nas células acometidas por determinada doença e que sejam ausentes ou minimamente expressos em tecidos saudáveis (WANG; THANOU, 2010).

A descoberta sobre a expressão do receptor para folato em algumas linhagens de cânceres humanos, como câncer de ovário e mama (CONEY et al., 1991), foi um marco importante e possibilitou o direcionamento de várias pesquisas. Parker e colaboradores (2005), durante o desenvolvimento de folato em células tumorais e tecidos normais, demonstraram uma expressão aumentada desses receptores em células tumorais do rim, bexiga, colo do útero, pâncreas, tumores cerebrais, mama e ovário. Por outro lado, em tecidos normais, essa expressão foi imensurável ou expressa em valores muito baixos. Cânceres como alguns linfomas, câncer de próstata, pâncreas, testículo e fígado não mostraram níveis elevados de receptores de folato (ZWICKE et al., 2012). Essas evidências possibilitaram o

uso dos receptores para folato como sítio para o direcionamento de fármacos às células tumorais.

Diante desses resultados duas estratégias foram desenvolvidas para entrega de fármacos mediada via receptor de folato. A primeira é por meio do acoplamento de anticorpos monoclonais contra esses receptores, a segunda está relacionada ao acoplamento do ácido fólico ou seus derivados folatados diretamente como ligante alvo (SUDIMACK; LEE, 2000). Para a segunda estratégia, a ligação do folato ao lipossoma, geralmente, é realizada mediante acoplamento às extremidades do PEG, que por sua vez está ligado a um lípide formador da bicamada lipídica. Desse modo, esse polímero irá atuar como um longo espaçador permitindo superar o impedimento estérico da superfície celular. Após o reconhecimento do folato, através da ligação específica pelo receptor na célula tumoral, o lipossoma é internalizado e direcionado ao endossoma, podendo liberar o fármaco a nível intracelular, com posterior regeneração dos receptores (JARACZ et al., 2005).

Em 2004, um estudo realizado no Instituto Avançado de Ciência e Tecnologia da Coreia mostrou a eficiência de um nanosistema carreador de doxorrubicina utilizando o direcionamento através de receptor para folato. A equipe produziu micelas poliméricas de circulação prolongada funcionalizadas com folato, com diâmetro médio em torno de 200 nm. As células da linhagem KB, carcinoma bucal, positivas para o receptor de folato, mostraram maior acúmulo de doxorrubicina que as células A549, carcinoma de pulmão, negativas para esse tipo de receptor. Por outro lado, a presença de folato livre juntamente com o nanosistema, inibiu o acúmulo de doxorrubicina, mostrando haver competitividade pela ligação aos receptores entre o folato livre e as micelas poliméricas funcionalizadas (YOO; PARK, 2004).

Além de proporcionar o direcionamento mais específico de fármacos, estudos vêm mostrando, em certos casos, a capacidade de carreadores com superfície modificada em superar, pelo menos parcialmente, a resistência a certos medicamentos (BERTRAND et al., 2014; SAWANT; TORCHILIN, 2012).

1.6 Paclitaxel em Sistemas Lipossomais

Diante da atividade do PTX contra vários tipos de tumores e seus inconvenientes, principalmente, em relação à formulação convencional, formulações livres do CrEL vem

sendo pesquisadas na tentativa de aumentar a atividade antitumoral e reduzir a toxicidade associada ao uso do Taxol[®]. Nesse contexto, os sistemas lipossomais têm sido alvo de vários estudos, uma vez que os lipossomas fornecem um sistema adequado para a incorporação do PTX nas bicamadas lipídicas, além de apresentar propriedades que os tornam biocompatíveis, imunogênicos e versáteis (LUO et al., 2012; KOUDELKA; TURÁNEK, 2012).

Dentre as diversas formulações lipossomais propostas para veiculação do PTX, diferentes abordagens têm sido utilizadas. Alguns estudos realizados em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – Estudos envolvendo o emprego de lipossomas na vetorização do PTX.

Composição (Razão molar)	Estudo biológico e linhagem tumoral	Resultados Obtidos	Referência
Lipossomas Convencionais			
PG:PC (1:9)	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (A90, Hey-1b, A121a, 9L, L1210, B16F10, B16, Colon-26) e toxicidade <i>in vivo</i> .	Maior atividade citotóxica em todas as linhagens avaliadas. Aumento DMT após administração ip e iv.	Sharma; Straubinger, 1994
DLPC	Atividade antitumoral <i>in vivo</i> (Renca).	Maior atividade antitumoral e sobrevivência prolongada nos animais.	Koshkina et al., 2001
Lipossomas de Circulação Prolongada			
EPC:PG:Chol: DPPE-PEG ₅₀₀₀ (9:1:2:0,7)	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (HT-29, MeWo), estudos de farmacocinética e biodistribuição <i>in vivo</i> .	Maior atividade citotóxica dos lipossomas peguilados após 48 horas e tempo de circulação sanguínea maximizado em 5 vezes.	Crosasso et al., 2000
S ₁₀₀ PC:Chol: DSPEmPEG ₂₀₀₀ (90:10:5)	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (MDA-MB-231, SK-BR-3), estudos de farmacocinética, biodistribuição e atividade antitumoral <i>in vivo</i> (MDA-MB-231).	Tempo de circulação aumentado em 3,5 vezes. Diminuição da captação pelo RES e maior atividade citotóxica <i>in vivo</i> .	Yang et al., 2007a

Continuação da Tabela 2. Estudos envolvendo o emprego de lipossomas na vetorização do PTX para a terapia do câncer.

HSPC:Chol: DSPE-PEG (90:10:5)	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (C-26), estudos de farmacocinética, biodistribuição e atividade antitumoral <i>in vivo</i> (C-26).	Biodistribuição aumentada em 3,6 vezes. Maior atividade antitumoral <i>in vivo</i> que a formulação não peguilada.	Yoshizawa et al., 2011
Lipossomas pH-sensíveis			
S ₁₀₀ PC:Chol:Chol-Hz- mPEG ₂₀₀₀ (90:10:3)	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (MCF-7)	Liberação mais eficiente (<i>in vitro</i>) e maior captação pelas células tumorais.	Chen et al., 2010
Lipossomas de Superfície Modificada			
DPPC:DMPG: DSPE-mPEG:DSPE-PEG- folato (85:5:9,5:4,5: 0,05) – Ligante- folato	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (KB)	Citotoxicidade aumentada em 3,8 vezes. Maior tempo de meia vida de circulação. Melhor estabilidade.	Wu et al., 2006
S ₁₀₀ PC:Chol:DSPE:mPEG ₂₀₀₀ 0:Mal-DSPE-PEG ₂₀₀₀ (90:10:4:1) e incubado com Herceptin-DSPE-PEG ₂₀₀₀ – Imunolipossomas – HerceptinTiolado	Estudo <i>in vitro</i> de captação celular (BT-474, SK-BR-3, MDA-MB- 231) e estudos de farmacocinética.	Captação celular maior para as células tumorais que apresentam o receptor HER2 (BT-474 e SK-BR-3). Maior tempo de circulação.	Yang et al., 2007b
DLPE:DLPG (9:1) e adição, posterior, de ácido hialurônico 0,1 M (na proporção total de substância lipídica) – Modificado com Ácido Hialurônico [#]	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (CT-26), ensaio de biomarcador sanguíneo, ensaio de produção de citocinas e atividade antitumoral <i>in vivo</i> (CT-26).	Maior acumulação no tecido tumoral. Redução na produção de citocinas pro-inflamatórias e atividade antitumoral 4 vezes maior quando comparada ao Taxol®	Rivkin et al., 2010

Continuação da Tabela 2. Estudos envolvendo o emprego de lipossomas na vetorização do PTX para a terapia do câncer.

Magnetolipossoma		
	Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	
HSPC:Chol:	(EMT-6), estudos de	Aumento em cerca de 5 vezes do
DCP:TOC	biodistribuição,	tempo de meia vida de circulação. Zhang et al.,
(62:31:7:2,5) e Fe ₃ O ₄ .	farmacocinética e toxicidade	Maior acúmulo na região tumoral. 2005
	aguda.	Menor toxicidade cardíaca.

PG: Fosfatidilglicerol; PC: Fosfatidilcolina; DLPC: Dilauroilglicerol fosfatidilcolina; EPC: Fosfatidilcolina de ovo; DPPE-PEG₅₀₀₀: Dipalmitoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 5000; SPC: Fosfatidilcolina de soja; DSPEmPEG₂₀₀₀: Dioleoilfosfatidiletanolamina associada ao metoxipolietilenoglicol 2000; DSPE-PEG₂₀₀₀: Dioleoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 2000; Chol: Colesterol; HSPC: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada; S₁₀₀PC: Fosfatidilcolina de soja 100%; Chol-Hz-mPEG₂₀₀₀: Colesterol ativado com hidrazina associado ao polietilenoglicol 2000; DPPC: Dipalmitoil fosfatidilcolina; DMPG: Dimiristoil fosfatidilglicerol; DSPE-PEG-folato: Dioleoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol e ao folato; Mal-DSPE-PEG₂₀₀₀: Dioleoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 2000 derivatizado com meleimide ; DLPE: 1,-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; DLPG: 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-glicerol; DCP: Colesterol dicetilfosfato; TOC: α -tocoferol; Fe₃O₄: Óxido de ferro; DMT: dose máxima tolerada; i.v: intravenoso; i.p: intraperitoneal; RES: sistema retículo endotelial; #: Ácido Hialurônico se liga ao receptores CD44 e CD168 – altamente expressões em algumas células tumorais.

No cenário farmacêutico mundial, a única formulação lipossomal contendo PTX e comercialmente disponível é a Lipusu[®], compostas por lipossomas convencionais, aprovado na China, a qual trouxe como benefício uma menor toxicidade em comparação ao Taxol[®]; no entanto, a eficácia antitumoral mostrou resposta similar ao tratamento convencional (KOUDELA; TURÁNEK, 2012).

1.7 Caracterização Física e Físico-Química dos Lipossomas

Devido a sua natureza coloidal e complexidade de constituintes, os sistemas veiculares, como lipossomas, necessitam de um conhecimento amplo de suas características e estruturas na tentativa de desenvolver sistemas adequados para a entrega de fármacos. Geralmente, a caracterização física e físico-química é complexa sendo necessárias várias técnicas de análises. A avaliação dessas características envolve: distribuição de tamanho das vesículas, potencial zeta ou carga superficial das partículas, determinação da concentração do fármaco associado aos lipossomas, análise morfológica e estrutural; e liberação do fármaco a partir dos lipossomas (MÜLLER-GOYMANN, 2004; BEIJA et al., 2012).

1.7.1 Diâmetro Médio das Vesículas Lipossomais

A obtenção de lipossomas com diâmetros reduzidos e distribuição homogênea é um parâmetro de fundamental importância para garantia da estabilidade de prateleira dessa forma farmacêutica e determinante no seu comportamento farmacocinético. Vários estudos utilizam lipossomas homogêneos com diâmetro médio que varia entre 50 a 150 nm. Esse intervalo de tamanho é o ponto médio que combina eficiência de encapsulação, estabilidade do sistema e capacidade de extravasamento através dos vasos sanguíneos (LASIC, 1988).

As técnicas mais comumente utilizadas para análise do diâmetro e distribuição de partículas incluem: técnicas de espalhamento de luz como a espectroscopia de correlação de fótons (PCS) (BERGER et al., 2001; INGEBRIGTSEN; BRANDL, 2002) e microscopia, como a microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica (KANNO et al., 2002; RUOZI et al., 2007), sendo que essas últimas ainda permitem avaliar a morfologia e estrutura dos nanosistemas.

No presente trabalho, a técnica utilizada para avaliar a distribuição de tamanho foi a PCS, a qual se baseia na análise do movimento browniano das partículas. Um feixe de laser incidente atravessa a amostra, de modo que as partículas dispersas no meio consigam espalhar a luz. Esse espalhamento está relacionado com o movimento browniano das partículas onde a intensidade da luz espalhada por essas, forma um padrão de movimento. Assim, é possível, mediante dispersão da luz, determinar o diâmetro médio das partículas. Partículas menores são capazes de se movimentar mais rapidamente causando rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas com diâmetros maiores, possuem menores coeficientes de difusão, resultando em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz (HASKELL, 1998).

1.7.2 Potencial Zeta

O potencial zeta influencia diretamente a estabilidade de preparações lipossomais, contribuindo ou não para a formação de agregados. A medida do potencial zeta é o método mais utilizado para estimar a carga superficial e interações repulsivas entre partículas de um

coloide, sendo comumente utilizada para inferir sobre a estabilidade desse tipo de sistema (CASALS et al., 2003).

A carga existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, no plano de cisalhamento, é definida como potencial zeta. A carga não pode ser medida diretamente, porém, pode-se estimar a grandeza da carga elétrica mediante medida de mobilidade eletroforética das partículas ao serem submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (HONARY; ZAHIR, 2013a; HONARY; ZAHIR, 2013b). Para a determinação do potencial zeta as amostras são submetidas à incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de forças conhecidas. As partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas, dependendo da carga superficial, ocasionando deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente. Os espectros de frequência gerados são utilizados para calcular a velocidade de deslocamento, que por sua vez, é convertida em valores de mobilidade. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta (MALVERN INSTRUMENTS, 1996).

A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão, considerando que, se todas as partículas apresentarem um valor altamente positivo ou negativo, elas irão repelir umas às outras evitando agregação. Preparações apresentando um potencial zeta inferior a ± 10 mV são geralmente instáveis, enquanto valores superiores a ± 30 mV conferem uma boa estabilidade. A agregação das partículas ocorre quando as forças de atração do tipo Van der Waals são maiores que as forças de repulsão eletrostáticas (MORA-HUERTAS et al., 2010).

O potencial de superfície também pode influenciar a resposta biológica do fármaco. Na circulação sistêmica, as partículas convencionais são rapidamente capturadas pelas células do SFM quando o diâmetro e a carga superficial são aumentados (MORA-HUERTAS et al., 2010).

1.7.3 Taxa de Encapsulação

A eficácia dos lipossomas *in vivo* e suas propriedades físico-químicas dependem da quantidade de substância encapsulada. A determinação da taxa de encapsulação refere-se à quantificação do percentual do fármaco retido nos lipossomas em relação à quantidade inicial empregada. Essa quantificação é realizada após a separação do fármaco não encapsulado

empregando-se métodos de purificação da preparação lipossomal, como a centrifugação, a diálise ou a cromatografia de gel filtração. Os lipossomas purificados são posteriormente desestabilizados com a adição de um agente surfactante, como por exemplo, o Triton X-100, ou álcool isopropílico, liberando-se o fármaco encapsulado, o qual é quantificado pelo uso de método específico.

É importante obter altas taxas de encapsulação, especialmente quando o fármaco possui doses elevadas ou quando não é possível o reaproveitamento do fármaco não encapsulado. A relação fármaco/lípide também deve ser maximizada, uma vez que determina a quantidade de lípide administrada ao paciente. Assim, quanto menor a quantidade de lípide veiculada, menores serão os riscos de efeitos colaterais associados ao uso da formulação lipossomal (FRÉZARD et al., 2005).

1.7.4 Análise Morfológica

Conhecer a morfologia de um sistema nanocarreador implica em avaliar as partículas individualmente e sua vizinhança em termos de rigidez, agregação, a forma de associação com o fármaco ou outro substrato dentre outros aspectos (PICAS et al., 2012). Para tal, técnicas microscópicas como a microscopia de transmissão eletrônica (TEM) e de força atômica (AFM) têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura de sistemas lipossomais (NAKANO et al., 2008; MINEMATSU et al., 2011).

Em particular, a TEM fornece informações sobre tamanho, distribuição e morfologia, porém os lipossomas podem sofrer perturbações em sua estrutura desencadeada pelas condições de alto vácuo e processos de coloração. Nos últimos anos, a AFM vem ganhando atenção na caracterização de lipossomas, sendo, portanto, a técnica utilizada no presente estudo. A AFM permite a obtenção de resultados em resolução dimensional de aproximadamente 1Å em diversas amostras, inclusive biológicas, sob diferentes condições ambientais e sem a necessidade de procedimentos sofisticados de preparo das amostras. Dessa forma, tornam as análises mais rápidas e de fácil execução, principalmente usando amostras em seu estado nativo (RUOZI et al., 2007). No entanto, a AFM requer a adsorção dos lipossomas em substratos e desse modo, por geralmente serem membranas fluidas, são deformadas como formas planares. Por outro lado, as áreas de superfícies refletem, com certa fidelidade, o tamanho e estruturas reais desses sistemas (KANNO et al., 2002).

O princípio básico de funcionamento da AFM envolve a força de interação entre uma sonda e a amostra, fornecendo informações importantes de distribuição de diâmetro, organização estrutural e outros. A figura 7 mostra um diagrama esquemático da configuração de um microscópio de AFM. O elemento principal é uma sonda extremamente fina, uma ponta em forma de pirâmide, ligado a um suporte (alavanca), também conhecido como cantilever, que está em contato com a superfície da amostra e que se movimenta em três dimensões em relação à mesma. À medida que a sonda se aproxima de determinada amostra, surgem forças de interação sonda-amostra as quais fazem o cantilever defletir. Essa deflexão é detectada por um sinal laser através de um fotodetector e todo o sistema é monitorado digitalmente, convertendo os dados topográficos da superfície da amostra (SITTERBERG et al., 2010).

Pequenas forças de interação sonda-amostra atrativas e repulsivas, em intensidade de nano-Newtons podem ser medidas. Dessa forma, a longas distâncias, essas interações praticamente não existem. À medida que a sonda se aproxima da amostra, forças atrativas passam a atuar, aumentando com a aproximação da sonda até que a separação seja de ordem inter-atômica. Nesse ponto, surgem forças eletrostáticas repulsivas sugerindo contato físico entre a sonda e a superfície da amostra (SITTERBERG et al., 2010).

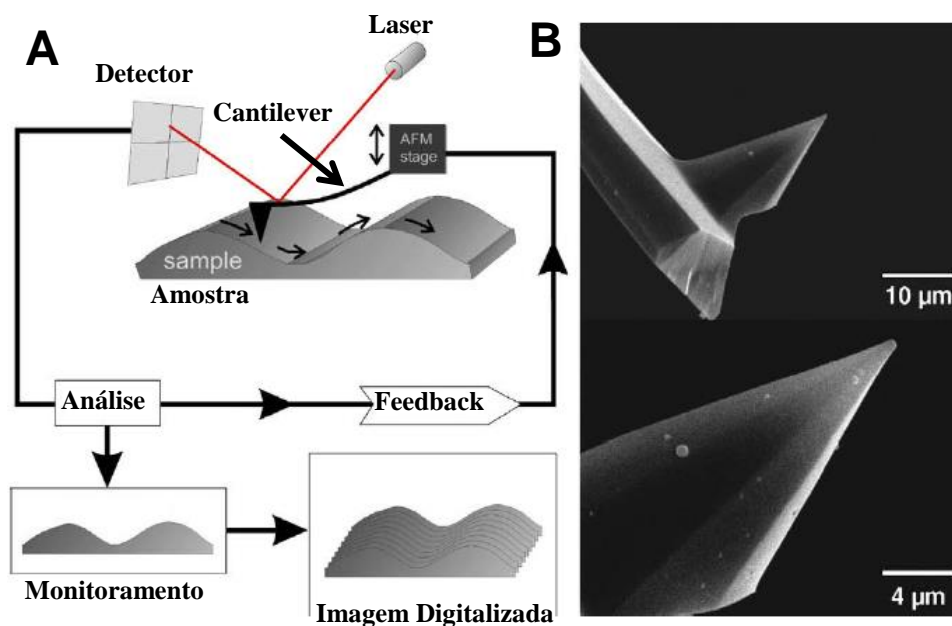


FIGURA 7 - (A) Esquema de configuração de um microscópio de força atômica. O sistema de cantilever-sonda determina a resolução e a qualidade das imagens obtidas. (B) Sistema cantilever – ponta típica de uma sonda usada em AFM (Adaptado de SITTERBERG et al., 2010).

Baseando nessas forças interativas, a AFM pode trabalhar em três diferentes modos de operação, sendo elas: I) contato, no qual a sonda fica permanentemente em contato com a superfície da amostra. As interações por forças repulsivas permitem obter imagens com alta resolução, ao nível atômico, porém o atrito constante pode danificar a superfície da amostra, obtendo imagens distorcidas. II) Contato intermitente propicia o contato sonda-amostra apenas em frações de segundos, ou seja, com regime de forças alternando entre atrativas e repulsivas, conseguindo altas resoluções sem deformação da amostra, possibilitando análise de amostras menos resistentes como membranas, células e os lipossomas. III) O modo não contato trabalha com regime apenas onde a força é atrativa, apresentando resolução limitada apesar da vantagem de não danificar a amostra (SITTERBERG et al., 2010).

1.7.5 Caracterização da Organização Supramolecular dos Lipossomas por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

As membranas lipossomais podem exibir diferentes níveis de fluidez de acordo com a composição dos seus fosfolípides. Em sua fase cristal-líquido as membranas possuem um comportamento de fase complexo que depende tanto da concentração dos lípides quanto da temperatura em que estão sendo formadas, influenciando sua estabilidade e a liberação do conteúdo carregado (FRÉZARD, 2005; NAGLE; TRISTAM-NAGLE, 2000).

As transições que ocorrem naturalmente ou em função de alguns fosfolípides presentes nas biomembranas, passando da fase lamelar (bicamada estável) para outras fases não lamelares tem sido objeto de investigação dos pesquisadores pela suposição da existência de uma relação entre este comportamento termodinâmico dos lípides e o processo de liberação intracelular de fármacos mediado por lipossomas (FATTAL et al., 2004).

Estruturas bem ordenadas como as bicamadas lipídicas conseguem espalhar uma radiação incidente, como os raios-X, de uma forma “especular” onde um fóton de uma única direção de entrada encontra-se disperso em uma única orientação de saída. Assim, o padrão de dispersão bidimensional resultante pode ser usado para determinar a estrutura do elemento de dispersão (DONG; BOYD, 2011).

As transições de fases dos lípides, sua organização supramolecular e o perfil das bicamadas lipídicas, portanto, podem ser analisados a partir do padrão de dispersão de raios-X (NASEDKIN et al., 2013) em diferentes condições experimentais.

A técnica de difração de raios-X consiste basicamente em um feixe de raios-X monocromático que incide sobre uma amostra e um detector instalado em um goniômetro, que varre o ângulo de espalhamento e faz a contagem do número de fótons da radiação espalhada para cada ângulo, gerando assim, o espectro de difração. A intensidade do espalhamento de raios-X produzidos por uma determinada amostra é uma função do ângulo de espalhamento. As informações estruturais de como os átomos estão dispostos em um conjunto, a distância e o ângulo intermolecular podem ser obtidos através da intensidade de dispersão dos raios-X em função do ângulo θ (DONG; BOYD, 2011).

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), é usado para detectar espalhamento em ângulos $\theta < 10^\circ$, o que corresponde a distâncias inter-planares com dimensões nanométricas. O SAXS tem sido objeto de estudos para os sistemas lipossomais no intuito de elucidar propriedades como a dinâmica de automontagem de lipossomas a partir de micelas e suas interações com diversas moléculas (LÓPEZ et al., 2002; WEISS et al., 2005), os efeitos da carga de fármacos sobre a estrutura das vesículas (SALVATI et al., 2007) e o mecanismo de liberação das moléculas e fármacos carregados mediante mudanças estruturais dos lipossomas em resposta a um estímulo, como os lipossomas pH-sensíveis (SILVA et al., 2011).

Na figura 8 é possível observar uma representação esquemática dos parâmetros estruturais das moléculas de DOPE organizadas na forma hexagonal (H_{II}) e na forma lamelar (L). Os modelos de célula unitária apresentados foram construídos a partir do espalhamento de raios-X e transformada de Fourier (TURNER; GRUNER, 1992). No corte transversal da estrutura hexagonal, d corresponde ao espaçamento hexagonal; d_{max} o comprimento maior da cadeia lipídica; d_{HII} o comprimento menor da cadeia lipídica e R_w a medida de raio do centro aquoso. Para os lipossomas organizados na fase lamelar, d corresponde à espessura da lamela; d_w , à espessura da porção hidrofílica e d_l , à espessura da bicamada.

Onde n é um número inteiro e d é a separação entre dois planos espalhantes. Quando existe uma série de planos igualmente espaçados, a intensidade espalhada $I(q)$ é quase zero, exceto onde a lei de Bragg é satisfeita. Nesse caso, a difração fornece uma série de picos igualmente espaçados a uma distância de $2\pi/d$ ao longo da direção normal dos planos (MERTINS, 2008).

Se uma amostra possui muitos microdomínios, com diversas orientações distribuídas aleatoriamente, as condições de Bragg serão satisfeitas para todos os valores de n e será possível a observação simultânea de todos os possíveis picos de difração. A intensidade de espalhamento medida no detector varia somente com a magnitude de q e não com sua direção. Assim, o perfil de espalhamento é representado por um gráfico de intensidade em função de q (MERTINS, 2008).

Um padrão de espalhamento com razões de distâncias intermoleculares iguais a 1, 2, 3, 4,..., infere que as moléculas dos lípides estão organizadas na fase lamelar; para razões iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, 3, $\sqrt{12}$..., a organização sugerida é a hexagonal e para razões iguais a 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{5}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, 3, a organização é sugestiva de cúbica (SEDDON, 1990).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada funcionalizada com folato contendo PTX e avaliar sua potencial utilização no tratamento do câncer de mama.

Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar um método analítico para o doseamento do PTX em formulações lipossomais por espectrofotometria derivada no ultravioleta.
- Avaliar a influência da composição lipídica quali e quantitativa e a concentração de PTX nas características físico-químicas (diâmetro médio, distribuição de tamanho das vesículas, índice de polidispersão, teor de encapsulação e potencial zeta) das formulações propostas;
- Avaliar a influência da composição lipídica nas propriedades de pH-sensibilidade e organização supramolecular dos lipossomas;
- Caracterizar a formulação lipossomal escolhida do ponto de vista morfológico através da microscopia de força atômica;
- Avaliar a estabilidade preliminar da formulação lipossomal;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da formulação lipossomal em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e células normais (L929).

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO A ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PARA O DOSEAMENTO DO PACLITAXEL

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos que permitem quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade no âmbito das pesquisas e na indústria farmacêutica (NOVÁKOVÁ et al., 2008).

A escolha do método de quantificação baseia-se em vários fatores que incluem estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade da amostra, disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, bem como etapas de preparo da amostra. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada a diferentes tipos de detectores tem representado o método de escolha para o desenvolvimento dos principais métodos analíticos e bioanalíticos (RAO et al., 2005).

Nesse contexto, para garantir que as características de desempenho do método analítico sejam entendidas e para demonstrar que o mesmo é cientificamente coerente, são necessárias algumas verificações que, coletivamente, são conhecidas como validação. A validação de um método estabelece, mediante estudos sistemáticos, que o mesmo é adequado à finalidade requerida, ou seja, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do questionamento analítico, assegurando a confiabilidade dos resultados. No Brasil, a validação de métodos analíticos e bioanalíticos é regulamentada pela Resolução Específica nº 899, publicada em 2 de junho de 2003 (ANVISA, 2003), enquanto, as diretrizes da Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) estabelecem os critérios para a validação de métodos analíticos no âmbito internacional (ICH, 2005). Os parâmetros fundamentais de avaliação considerados durante a validação de um método analítico são especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e limites de detecção e quantificação.

A CLAE é o método analítico preconizado para o doseamento do PTX e o mais utilizado, de acordo com a literatura, na quantificação desse fármaco em amostras biológicas, matéria-prima e produto acabado (HUIZING et al., 1995; MARTIN et al., 1998; CIUTARU et al., 2004; BADEA et al., 2004; MITTAL et al., 2007; USP32, 2008). Apesar das vantagens indubitáveis da CLAE, essa apresenta algumas limitações como alto custo de instrumentação e operação, tempo relativamente longo para análise e necessidade de experiência no manuseio do equipamento e processamento de amostras (TAVARES et al., 2012).

Os métodos espectrofotométricos associados ao tratamento de dados têm sido frequentemente utilizados na quantificação de fármacos devido sua disponibilidade de instrumentação, simplicidade e rapidez. A melhor técnica para esse fim é a derivação das curvas espectrofotométricas de absorbâncias *versus* comprimento de onda conhecida como espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (ED-UV) (MARKOVIC et al., 2010) .

Essa técnica permite revelar detalhes espectrais que não são observados em um espectro normal, conseguindo assim, contornar um problema analítico clássico que é a sobreposição das bandas eletrônicas da espectrofotometria convencional na região do ultravioleta. A transformação do espectro clássico ou de ordem zero através da derivação do mesmo pela técnica de ED-UV possibilita a separação de sinais sobrepostos e a melhor individualização dos constituintes da amostra pelo aumento do número de bandas de absorção, obedecendo a Lei de Beer-Lambert (PASCHOAL et al., 2003; DONATO et al., 2010). Desse modo, a ED-UV permite determinar simultaneamente dois ou mais fármacos, ou mesmo uma substância que sofra a interferência de outros componentes presentes na amostra, sem tratamento prévio da mesma (DONATO et al., 2010; BRAGA et al., 2012; OJEDA; ROJAS, 2013).

Diversas técnicas ou métodos de derivada são encontrados na literatura para a quantificação de fármacos: zero pico, ponto de anulação, derivada da calibração de espectros, calibração multiderivada, dentre outras. A técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* é a mais utilizada, permitindo quantificar uma determinada substância em um dado comprimento de onda em que a derivada dos outros componentes da formulação apresenta valor igual a zero ou não significativo, e vice-versa (DONATO et al., 2010; OJEDA; ROJAS, 2013).

A ED-UV apresenta maior sensibilidade e maior seletividade quando comparada à espectrofotometria convencional. O aumento da seletividade deve-se à separação das bandas sobrepostas, enquanto o aumento da sensibilidade é atribuído à amplificação do sinal da derivada e diminuição do ruído. Parâmetros instrumentais como a ordem da derivada, o incremento do delta lambda ($\Delta\lambda$) na qual a derivada é obtida, a suavização e a escolha do ponto de anulação devem ser otimizados e usados com cautela para se obter uma boa resolução da banda espectral e uma boa seletividade e sensibilidade do método (EL-SAYED; EL-SALEM, 2005; DONATO et al., 2010; OJEDA; ROJAS, 2013).

Trabalhos recentes vêm mostrando a eficiência da espectrofotometria derivada para determinação de fármacos, eliminando a interferência de outros fármacos presentes, produtos de degradação e excipientes das formulações convencionais e nanoestruturadas (MARTINS et

al., 2007; DASTIDAR; SA, 2009; PATEL et al., 2010; MALIPATIL et al., 2011; BRAGA et al., 2012; TAVARES et al., 2012).

Até o momento, não existem relatos na literatura que reportem a quantificação do PTX por ED-UV. Assim, nessa primeira parte do estudo foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico usando a derivada na região do ultravioleta, para quantificação do PTX em formulações lipossomais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

O PTX foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) com pureza maior que 97%. O metanol foi obtido da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil) e ProQuímios (Rio de Janeiro, Brasil), o álcool isopropílico foi adquirido também pela Isofar (Rio de Janeiro, Brasil). As demais substâncias utilizadas foram de grau reagente, sem purificação adicional.

2.1.2 Equipamentos e condições de análise

O espectrofotômetro utilizado foi o modelo UV-6300 PC com feixe duplo e largura de banda correspondente a 0,5; 1; 2 e 4 nm da marca ALLCROM, monitorado por um computador utilizando o *software* UV-Vis *Analyst*. Para a leitura, foi utilizado cubeta de quartzo de caminho óptico correspondente a 1 cm e os espectros de varredura na região do ultravioleta foram obtidos em comprimento de onda (λ) de 200 a 400 nm. Em seguida, o espectro de ordem zero foi submetido à conversão para obtenção da primeira derivada ($dA/d\lambda$) com $\Delta\lambda$ igual a 2 nm e fator de escala igual a 1, sendo o λ igual a 246 nm escolhido como o ponto de anulação ou *zero crossing*. Esse λ foi escolhido, uma vez que, a absorção para os componentes da matriz lipossomal é nula diferentemente da observada para o PTX. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, após o aparelho ter sido zerado com metanol.

Foram utilizados também balança analítica Mettler Toledo[®] (modelo AB 204), centrífuga de bancada refrigerada Sigma[®] (modelo 4k-15) e medidor de pH de bancada digital Tecnopom[®] (modelo mPA210).

2.2 Métodos

2.2.1 Especificidade

Com o objetivo de verificar a interferência dos componentes dos lipossomas na análise quantitativa do PTX, foi feita uma comparação do espectro de ordem zero obtido para uma solução de PTX (15 µg/mL), com o espectro de ordem zero obtido para a formulação de lipossomas brancos (LpHS, isentos de PTX). Os lipossomas foram compostos por DOPE/CHEMS/DSPE-PEG, razão molar 5,7:3,8:0,5 e preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Após preparação, os LpHS foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm, a 4°C, por 10 minutos, para eliminação de possíveis resíduos de titânio da sonda de sonicação.

Os lipossomas foram solubilizados em álcool isopropílico, na proporção volumétrica de 1:3 e, posteriormente, diluídos em metanol para um volume final de 1,5 mL, até a máxima concentração lipídica utilizada nas condições de trabalho (20 mM). Em seguida, as varreduras das soluções correspondentes aos LpHS e ao PTX na região do ultravioleta (200 a 400 nm) foram obtidas, verificando as sobreposições das bandas espectrais. Posteriormente, os espectros derivativos foram obtidos a partir dos espectros de ordem zero até otimização do ponto de anulação para os espectros dos LpHS, mantendo uma boa resolução das bandas espectrais bem como boa seletividade e sensibilidade do método.

2.2.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade do método por ED-UV foi construída uma curva de calibração apresentando oito pontos relativos a diferentes concentrações de soluções de PTX em metanol, preparadas e analisadas em triplicatas, ou seja, três curvas foram obtidas em três dias diferentes.

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque padrão contendo 200 µg/mL de PTX, solubilizando-se aproximadamente 10 mg do fármaco, exatamente pesados, em 25 mL de metanol. Essa preparação foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com metanol, seguido da homogeneização. A partir dessa

solução, alíquotas de 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,75; 0,90; 1,05 e 1,20 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, o volume de cada balão foi completado com metanol, para obtenção das respectivas concentrações: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, e 24 µg/mL. As soluções foram analisadas no espectrofotômetro utilizando as condições descritas no item 2.1.2. A curva de calibração foi construída a partir dos valores de $dA/d\lambda$ x concentração de PTX (µg/mL).

2.2.3 Precisão

Para a determinação da precisão intra-dias foram preparadas seis soluções de PTX 15 µg/mL (correspondente a 100% da concentração do teste) em metanol, a partir de uma solução estoque de 200 µg/mL, as quais foram analisadas mediante as condições descritas no item 2.1.2. Para a determinação da precisão inter-dias, soluções idênticas às anteriores foram preparadas dois dias após a análise da precisão intra-dias e analisadas conforme descrito.

A precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR%) das concentrações médias determinadas (CMD), dado pela fórmula:

$$DPR = DP/CMD \times 100$$

onde DP é o desvio padrão das CMD (ANVISA, 2003).

2.2.4 Exatidão

Para a determinação da exatidão foram adicionadas soluções de PTX às formulações de LpHS, previamente preparados, em três concentrações diferentes sendo: 12 µg/mL (baixa concentração), 15 µg/mL (média concentração) e 18 µg/mL (alta concentração). Todas as amostras foram preparadas em triplicatas ($n = 9$) e posteriormente analisadas mediante condições descritas no item 2.1.2.

A exatidão foi expressa pela relação entre a CMD e a concentração teórica (CT) correspondente, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \text{CMD}/\text{CT} \times 100.$$

2.2.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante mudança da fonte fornecedora do metanol (ProQuimios e Isofar) e da acidez do mesmo pela adição de 0,1 mL de uma solução de ácido clorídrico a 0,1 M em 50 mL de metanol. Para determinação, foram preparadas soluções de PTX 15 µg/mL a partir de uma solução estoque de PTX a 200 µg/mL pela transferência de 0,75 mL dessa solução para balões volumétricos de 10 mL. Em seguida o volume do balão foi completado com metanol, de acordo com cada alteração no parâmetro e analisados de acordo com o item 2.1.2.

Os resultados da robustez foram expressos como a média da concentração do analito e o DPR%.

2.2.6 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados por meio de cálculos matemáticos baseados na média das três curvas de calibração utilizando as seguintes equações, respectivamente:

$$LD = 3.3\sigma/IC$$

e

$$LQ = 10\sigma/IC$$

onde, LD é o limite de detecção estimado (µg/mL); LQ é o limite de quantificação estimado (µg/mL); σ é o desvio padrão médio obtido por meio da curva de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

2.2.7 Análise Estatística

A linearidade do método foi avaliada mediante o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e pelo coeficiente de correlação linear (r). Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo utilizou-se a análise de variância (ANOVA). Os outros parâmetros foram verificados por análise do DP, DPR e Recuperação Média como preconizados pela RDC nº 899 (ANVISA, 2003) e *ICH* (ICH, 2005). As médias obtidas no teste de precisão bem como o coeficiente de variação entre as médias obtido no teste de robustez foram analisados pelo teste t de *Student*, utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de substâncias através de métodos analíticos é um processo baseado em dados quantitativos, e por isso, é de extrema importância verificar a qualidade dos resultados com o objetivo de garantir confiabilidade. Ao propor um método analítico inexistente nos compêndios oficiais, sempre é necessário que esse método passe por um conjunto de critérios conhecidos como validação (ANVISA, 2003).

No processo de validação, é importante detectar erros sistemáticos dos procedimentos analíticos e oferecer evidências comprovadas que o método é capaz de realizar, de forma adequada, aquilo que se pretende. E isso consiste em realizar uma série de ensaios analíticos e estudos que comparem os resultados obtidos com os critérios pré-estabelecidos por regulamentações nacionais e/ou internacionais. Dessa forma, o método proposto nesse estudo para a quantificação do PTX foi desenvolvido e validado segundo os critérios estabelecidos pela RDC nº 899 de 2003 e as diretrizes da *ICH* de 2005, em termos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de quantificação e detecção.

3.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método analítico em diferenciar e quantificar, exatamente, um determinado composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os espectros de ordem zero no ultravioleta mostraram um pico máximo de absorção para a solução de PTX em 227 nm e para os componentes dos LpHS em, aproximadamente, 210 nm. Na figura 9, observa-se que as bandas de transição eletrônica do espectro de ordem zero dos LpHS se sobrepõem às do fármaco. Não foi encontrado um λ nos referidos espectros em que esses interferentes tivessem absorção desprezível, impossibilitando a determinação do PTX na presença da matriz lipossomal, uma vez que, pode levar um aumento da absorção desse fármaco (PASCHOAL et al., 2003). Portanto, o método clássico da espectrofotometria na região do UV não pode ser aplicado para a determinação do PTX presente nessa matriz.

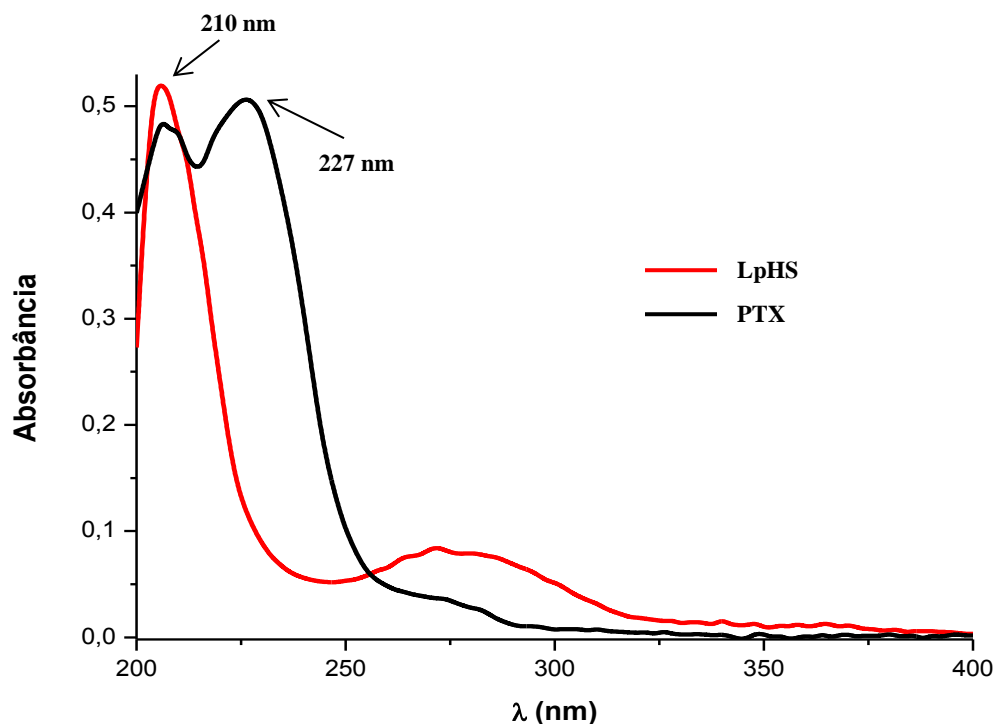


FIGURA 9 - Espectro de absorção de ordem zero obtido na região do ultravioleta (200 a 400 nm) para uma solução do PTX 15 µg/mL e lipossomas brancos (LpHS) em metanol.

Na busca de métodos analíticos para quantificação de substâncias em matrizes complexas, a ED-UV tem se mostrado eficiente para a determinação de princípios ativos (EL-SAYED; EL-SALEM, 2005). Como já mencionado, a ED-UV é uma técnica que permite a detecção simultânea de dois ou mais compostos na mesma amostra, ou mesmo um composto que sofre interferência de outros constituintes da formulação mediante sobreposição das bandas espectrais, sem a necessidade de separações prévias (PASCHOAL et al., 2003; DONATO et al., 2010; BRAGA et al., 2012; OJEDA; ROJAS, 2013), como ocorreu com o PTX no referido sistema lipossomal. Portanto, a derivação do espectro possibilita melhorar a resolução, separando sinais sobrepostos e, conseqüentemente, eliminar possíveis interferentes dos componentes lipídicos.

A primeira derivada ($dA/d\lambda$) é a razão entre a variação da absorbância versus o variação do comprimento de onda (DONATO et al., 2010). Na figura 10 observa-se o espectro da $dA/d\lambda$ com $\Delta\lambda$ igual a 2, faixa de varredura de 200 a 400 nm e fator de escala 1. Os dados demonstraram a anulação da interferência dos componentes do LpHS no λ igual a

246 nm, e ausência de anulação para a solução de PTX nesse mesmo λ , o que possibilita a detecção apenas para o fármaco em questão.

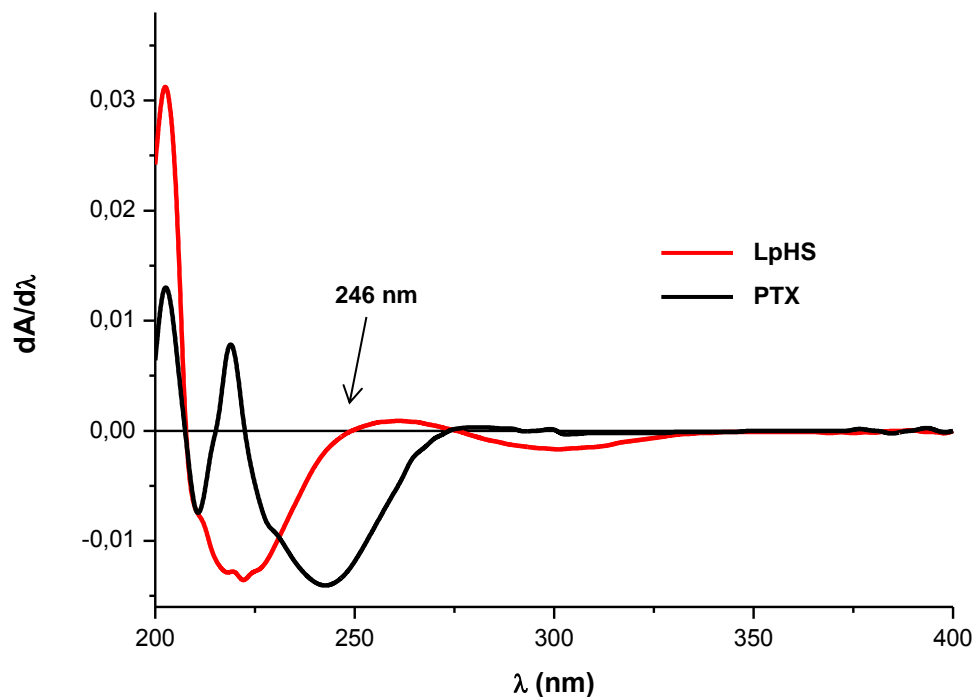


FIGURA 10 - Espectro de absorção de primeira derivada obtido para uma solução do PTX 15 $\mu\text{g/mL}$ e dos (LpHS) em metanol, utilizando $\Delta\lambda = 2$ nm e fator de escala 1. A seta com o comprimento de onda indica o ponto de anulação para os componentes dos lipossomas.

Com a finalidade de aprimorar a técnica empregada, alguns parâmetros podem ser ajustados experimentalmente como fator de escala e o $\Delta\lambda$ (TAVARES et al., 2012). De acordo com Donato e colaboradores (2010) a otimização do $\Delta\lambda$ reflete em uma melhor seletividade, alta sensibilidade e adequação sinal ruído, uma vez que este afeta a forma do espectro da derivada. A fim de avaliar a influência do $\Delta\lambda$ sobre o espectro da derivada, esse parâmetro foi alterado para 4 e 8, mantendo a $dA/d\lambda$ com faixa de varredura de 200 a 400 nm e fator de escala 1. No entanto os resultados mostraram uma perda de resolução espectral com diminuição da amplitude do sinal e perda do ponto de anulação (Figura 11) que, possivelmente, pode prejudicar a sensibilidade do método quando comparado com o $\Delta\lambda$ igual a 2.

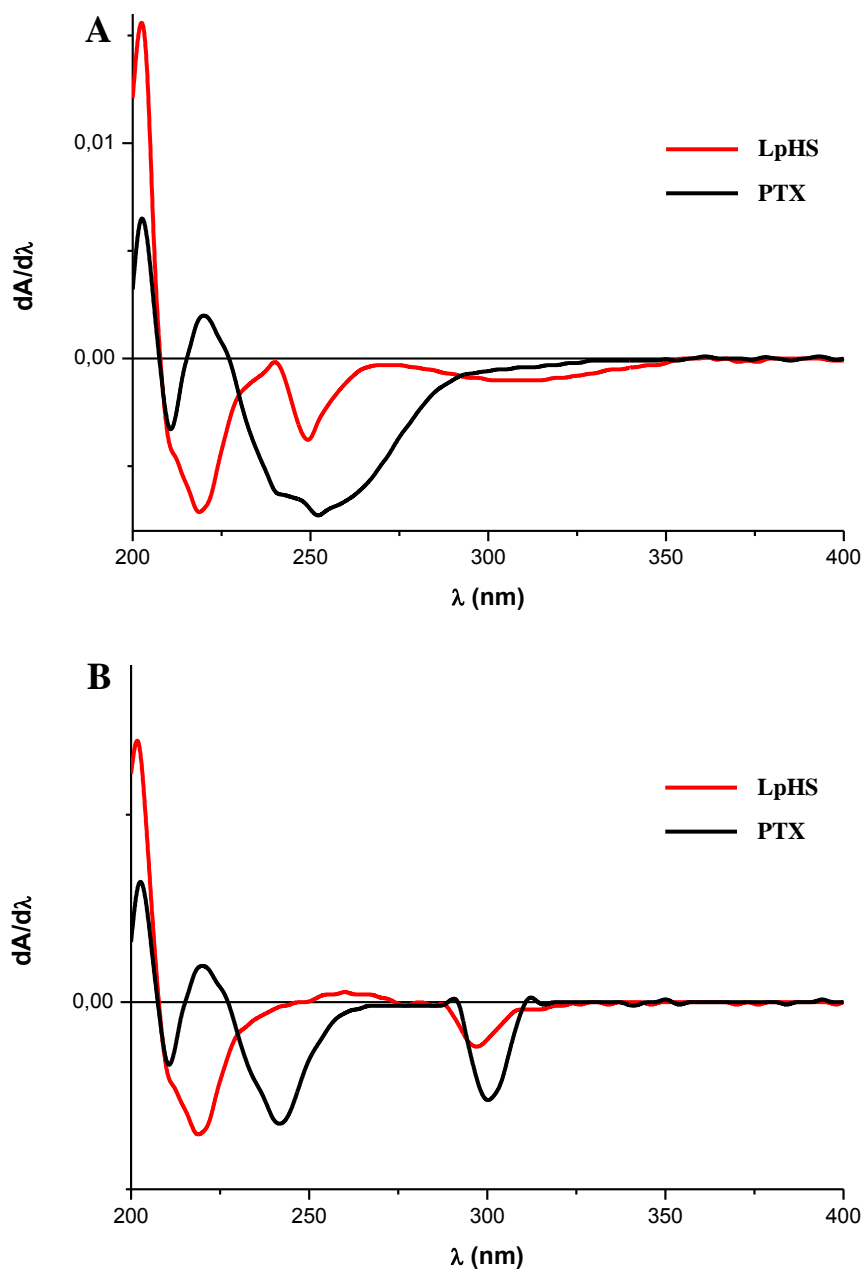


FIGURA 11 - Espectro de absorção de primeira derivada obtido para uma solução do PTX 15 $\mu\text{g/mL}$ e dos lipossomas brancos (LpHS) em metanol, utilizando fator de escala 1 e $\Delta\lambda = 4$ nm (A) e $\Delta\lambda = 8$ nm (B).

Resultados semelhantes foram observados durante a quantificação do lopinavir e ritonavir em uma formulação farmacêutica. Ao aumentar o valor de $\Delta\lambda$ de 2 para 4 foi relatado uma diminuição da frequência de onda dos espectros e consequentemente dos pontos de anulação que possibilitava a quantificação dos fármacos (DONATO et al., 2010).

O fator de escala altera apenas a amplitude da onda dos espectros (DONATO et al., 2010). Segundo Toral e colaboradores (2002) o valor do fator de escala deve ser avaliado a fim de evitar o efeito de distorção nos espectros, sendo considerado um parâmetro mais visual. Nesse estudo, adotou-se fator de escala igual a 1, uma vez que, visualmente, os espectros apresentaram boa resolução e adequada relação sinal-ruído.

Para utilização do presente método na quantificação do PTX nas formulações desenvolvidas nesse estudo, foram realizadas análises da especificidade para formulações lipossomais mediante a inclusão do DSPE-PEG-folato e da fosfatidilcolina de soja (SPC), e os resultados mostraram que esses componentes não promoveram interferência da especificidade do método pelas condições propostas (ANEXO A).

Portanto, para assegurar a eliminação dos interferentes dos componentes lipídicos, foram estabelecidos os seguintes critérios para o método analítico: primeira derivada ($dA/d\lambda$), com $\Delta\lambda$ igual a 2 nm, fator de escala 1 e o ponto de anulação para o LpHS em λ igual a 246 nm.

3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio da curva analítica e está relacionada à capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, de acordo com um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

A curva analítica para o método, resultante da média de três curvas padrão construída a partir das oito concentrações analisadas, em dias diferentes está representada na Figura 12. Os dados foram ajustados por análise de regressão linear e a equação da reta obtida foi $y = 0,00097x + 0,00038$ com coeficiente de determinação linear (r^2) igual a 0,9991. Uma correlação linear (r) igual a 0,9995 foi obtida entre a amplitude dos picos em 246 nm e a concentração correspondente de PTX no intervalo de 3,0 a 24,0 $\mu\text{g/mL}$.

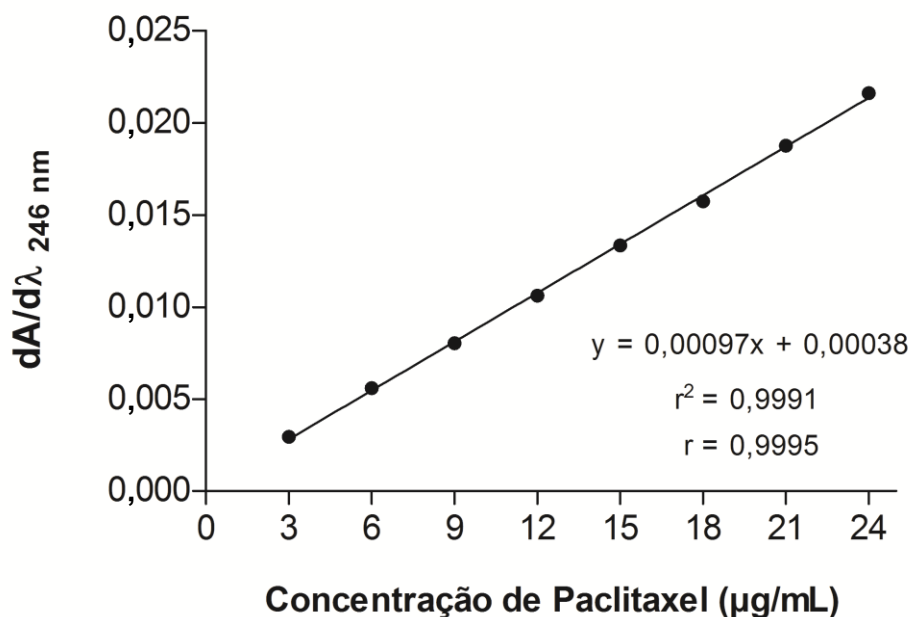


FIGURA 12 - Representação gráfica da curva analítica para doseamento do PTX obtida pelo método ED-UV, com a equação da reta, o valor do coeficiente de determinação linear (r^2) e valor de correlação linear (r). Os valores de $dA/d\lambda_{246\text{ nm}}$ foram expressos em módulo.

Essa correlação linear mostra que o método segue a linearidade no intervalo proposto, estando de acordo com as especificações exigidas pela RDC nº 899 (ANVISA, 2003) e pelo ICH (ICH, 2005), que estabelecem linearidade a um método analítico quando sua correlação linear é superior a 0,99.

A ANOVA dos resultados obtidos (Tabela 3) demonstrou uma regressão altamente significativa. Ademais, não foi observado desvio da linearidade, uma vez que, o valor de F calculado foi menor do que o valor de F crítico no nível de 95% de confiança.

TABELA 3 - Análise de variância dos dados de linearidade do método de doseamento do PTX por ED-UV.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valores de F	
				F _{calculado}	F _{crítico}
Regressão	0,000572	1	0,000572	165046,82	4,41 ^a
Resíduos	0,000178	18	0,0000000347	-	-
Desvio da Linearidade	0,0000715	6	0,0000119	1,345	2,99 ^a
Erro Puro	0,000106	12	0,00000886	-	-
Total	0,00075	19	-	-	-

^aValor teórico baseado no teste de ANOVA.

3.3 Precisão

Um método preciso é aquele que apresenta um grau adequado de concordância entre os resultados de análises individuais, em idênticas condições de ensaio (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A precisão é determinada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Nesse estudo, esse parâmetro foi avaliado pelos estudos de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dias). A primeira é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, sendo verificada por no mínimo seis determinações a 100%. A precisão inter-dias é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes com analistas e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003).

Na tabela 4 estão apresentados os valores das concentrações determinadas com DP e DPR% relativos às seis soluções de PTX 15 µg/mL analisadas em um mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. Em ambos os casos, os valores de DPR foram inferiores a 5% conforme preconizado pela ANVISA (2003), e a 2% como é estabelecido pelo ICH (2005), indicando precisão adequada ao método analítico proposto em termos de precisão intra-corridas e inter-corridas. Além disso, o teste *t* de *Student* revelou resultados semelhantes ($p = 0,77$) para as CMD nos dias 1 e 2.

TABELA 4 - Determinação da precisão intra-dia e inter-dias para o método de doseamento do PTX por ED-UV.

Concentração Nominal (µg/mL)	Dia	dA/dλ _{246nm} *	Concentração Calculada (µg/mL)	CMD ^a ± DP ^b (µg/mL)	DPR ^c (%)	
					Intra-dia	Inter-dias
15,0	1	0,0152	15,3	15,2 ± 0,1	0,7	0,6
		0,0151	15,2			
		0,0151	15,2			
		0,0150	15,1			
		0,0152	15,3			
		0,0153	15,4			
	2	0,0150	15,1	15,2 ± 0,1	0,6	0,6
		0,0152	15,3			
		0,0151	15,2			
		0,0152	15,3			
		0,0152	15,3			
		0,0151	15,2			

^aConcentração Média Determinada^bDesvio Padrão^cDesvio Padrão Relativo*Os valores de dA/dλ_{246 nm} foram expressos em módulo

3.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ANVISA, 2003).

A exatidão do método foi estabelecida pelo teste de recuperação do analito e os resultados estão expressos na tabela 5. Para todas as concentrações analisadas a faixa de recuperação média do PTX ficou compreendida entre 100,4 a 101,3 %, e o maior DPR foi de 1,3 %. Esses dados comprovam boa exatidão para o método proposto, sugerindo que pequenas variações da concentração de PTX, poderão ser prontamente quantificadas. Além disso, a faixa de recuperação média do PTX ficou compreendida nos intervalos estabelecidos pelo ICH (2005) e ANVISA (2003), sendo de 98 a 102% e 95 a 105%, respectivamente.

TABELA 5 - Determinação da exatidão do método de doseamento do PTX por ED-UV.

Concentração Nominal (µg/mL)	dA/dλ _{246nm} *	Concentração Observada (µg/mL)	CMD ^a ± DP ^b (µg/mL)	Recuperação Média (%)	DP ^b	DPR ^c (%)
12,0	0,0122	12,2	12,1 ± 0,2	100,4	0,2	1,3
	0,0121	12,1				
	0,0119	11,9				
15,0	0,0150	15,1	15,1 ± 0,1	100,7	0,1	0,4
	0,0150	15,1				
	0,0151	15,2				
18,0	0,0181	18,3	18,2 ± 0,2	101,3	0,2	0,9
	0,0179	18,1				
	0,0182	18,4				

^aConcentração Média Determinada^bDesvio Padrão^cDesvio Padrão Relativo*Os valores de dA/dλ_{246 nm} foram expressos em módulo

3.5 Robustez

A capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos é conhecida como robustez (ANVISA, 2003). Um método é considerado robusto quando, os valores de DPR são inferiores a 2% (ICH, 2005) ou 5% (ANVISA, 2013) e a faixa de recuperação média do analito fica compreendida entre 98 e 102% (ICH, 2005) ou 95 a 105% (ANVISA, 2013).

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos após alteração do fornecedor do metanol e alteração da acidez do solvente por adição de 0,1 mL de HCl 0,1 M. Em ambos os casos, os valores de DPR foram inferiores a 2% e a recuperação média do analito foi em torno de 100%. Além disso, a análise dos dados pelo teste *t* de *Student* mostrou valores de *p* iguais a 0,64 e 0,85 para variação do fornecedor de metanol e mudança de acidez, respectivamente, demonstrando que o método é robusto para as condições analisadas.

TABELA 6 - Determinação da robustez do método de doseamento do PTX por ED-UV.

Concentração Nominal (µg/mL)	Parâmetro Alterado	dA/dλ _{246nm} *	Concentração Calculada (µg/mL)	CMD ^a ± DP ^b (µg/mL)	Recuperação Média (%)	DP ^b	DPR ^c (%)
15	Metanol ProQuímios	0,0152	15,3	15,2 ± 0,1	101,5	0,7	0,7
		0,0151	15,2				
		0,0151	15,2				
		0,0150	15,1				
		0,0152	15,3				
		0,0153	15,4				
	Metanol Isofar	0,0151	15,2	15,1 ± 0,2	100,7	1,0	1,0
		0,0148	14,9				
		0,0151	15,2				
		0,0149	15,0				
		0,0152	15,3				
		0,0151	15,2				
	Metanol ProQuímios acrescido de 0,1 mL de HCl 0,1 M	0,0150	15,1	15,1 ± 0,2	100,8	1,0	0,9
		0,0152	15,2				
		0,0149	15,0				
		0,0152	12,3				
		0,0151	15,2				
		0,0149	15,0				

^aConcentração Média Determinada^bDesvio Padrão^cDesvio Padrão Relativo*Valores de dA/dλ_{246 nm} foram expressos em módulo

3.6 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção é o menor valor de concentração da substância em análise possível de ser detectada, porém não quantificado de forma precisa e exata (ANVISA, 2003). Empregando-se os devidos cálculos, o LD obtido para o PTX foi igual 0,99 µg/mL. Portanto, valores de concentrações desse fármaco igual ou superiores ao LD foram diferenciados do ruído do equipamento e detectados (ANVISA, 2003).

Por outro lado, o limite de quantificação de um método de análise reflete a menor concentração da substância em análise que possa ser medida precisa e exatamente, utilizando

um determinado procedimento analítico (ANVISA, 2003). Nesse sentido, o LQ foi igual a 3,3 µg/mL. Como consequência, valores de concentração de PTX igual ou superior ao valor estimado são quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pelo método proposto, demonstrando boa sensibilidade ao mesmo (ANVISA, 2003).

Dessa forma, o método por ED-UV proposto para o doseamento do PTX na formulação lipossomal apresentou especificidade em relação aos componentes dos lipossomas, linearidade na faixa de 3,0 a 24,0 µg/mL, precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária, exatidão e robustez, conforme as diretrizes estabelecidas pela RDC nº 899 (ANVISA, 2003) e pela ICH (2005); além de boa sensibilidade, mediante análises dos limites de detecção e quantificação.

4 CONCLUSÃO

Até o presente momento, não há descrição na literatura de um método analítico por espectrofotometria derivada de primeira ordem para a quantificação do PTX em formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DESPE-PEG. Diante disso, um novo método de ED-UV, usando a $dA/d\lambda$, foi desenvolvido para a determinação desse fármaco nesse sistema lipossomal. O método desenvolvido foi capaz de eliminar os interferentes dos componentes lipossomais, permitindo a quantificação do PTX nas formulações com adequada precisão, exatidão e sensibilidade. Esse método é uma alternativa simples, rápida e menos onerosa em comparação com a CLAE, preconizada como método farmacopeico, sendo facilmente aplicado na determinação do PTX encapsulado em nanocarreadores.

CAPÍTULO 2

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS
CONTENDO PACLITAXEL**

1 INTRODUÇÃO

Embora apresente atividade antitumoral comprovada contra vários tipos de tumores sólidos, a utilização clínica do Taxol[®] tem sido limitada em função da toxicidade induzida pelo CrEL, dos problemas relacionados com a alteração da farmacocinética do PTX e de instabilidade físico-química comumente associada à formulação do Taxol[®] (GUCHELAAR et al., 1994; ROWINSKY; DONEHOWER, 1995; PANCHAGNULA, 1988; SOUZA, 2004; SCRIPTURE et al., 2005; MIELKE et al., 2006; ZHANG et al., 2014). Na tentativa de evitar esses inconvenientes, diferentes formulações lipossomais têm sido propostas, possibilitando assim reduzir a toxicidade associada ao tratamento convencional; garantir uma associação maior do PTX a sistemas aquosos; melhorar a liberação do PTX; aumentar sua concentração efetiva na região tumoral e, conseqüentemente, melhorar o índice terapêutico desse fármaco (CROSASSO et al., 2000; YANG et al., 2007a; WU et al., 2006; RIVKIN et al., 2010; LUO et al., 2012; FENG; MUMPER, 2013).

As formulações lipossomais contendo PTX têm sido desenvolvidas e testadas com sucesso em vários modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, quando comparadas ao Taxol[®], exibindo baixa toxicidade e maior eficiência antitumoral (KOUDELA et al., 2010). As primeiras formulações testadas foram os lipossomas convencionais que, apesar de apresentarem eficiência no encapsulamento do PTX, mostraram o inconveniente de serem capturados pelas células do SFM sendo eliminados da corrente sanguínea antes de desencadear suas ações. Além disso, apresentaram estabilidade de armazenamento limitada (SHIEH et al., 1997).

Com os avanços no conhecimento da biologia tumoral e na tentativa de tornar os lipossomas mais específicos e direcionados para as células neoplásicas, estudos têm focado na funcionalidade e reatividade dos lipossomas contendo PTX. A inserção de um polímero inerte e biocompatível, o PEG, na superfície dos lipossomas possibilitou a formação de uma camada protetora e hidrofílica que resultou no aumento da meia vida de circulação sanguínea desses sistemas minimizando o sequestro e a captura dos lipossomas pelas células do SFM. Yang e colaboradores (2007a) durante o desenvolvimento de uma formulação lipossomal de circulação prolongada composta por S₁₀₀PC, Chol e DSPE-PEG, numa razão molar de 90:10:0,5, conseguiram uma melhoria na solubilidade aquosa do PTX, para cerca de 3,4 mg/mL. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram um tempo maior na meia-vida de

circulação sanguínea desses lipossomas em comparação aos convencionais e uma maior efetividade na inibição do crescimento tumoral quando comparado ao tratamento com Taxol[®].

O desenvolvimento de lipossomas mais específicos e direcionados para as células tumorais, principalmente no âmbito da entrega de fármacos no interior das células também tem sido reportado. Esses sistemas são projetados mediante modificação de sua superfície com ligantes específicos para moléculas presentes nas células neoplásicas e/ou de sua reatividade frente a alteração do pH, temperatura, dentre outros.

Wu e colaboradores (2006) desenvolveram uma formulação de lipossomas de circulação prolongada funcionalizada com folato contendo PTX. Esta formulação foi composta de DPPC, DMPG, DSPE-PEG e DSPE-PEG-folato em uma razão molar de 85,5:9,5:4,5:0,5, respectivamente, e mostrou uma eficiência de encapsulação de 98% e atividade citotóxica 3,8 vezes maior em comparação com os lipossomas não funcionalizados, para a linhagem de carcinoma bucal, células KB. Esse resultado foi possível, uma vez que, algumas linhagens tumorais humanas apresentam superexpressão de receptores para folato. E, por outro lado, em tecidos normais essa expressão é mínima ou inexistente, possibilitando assim o reconhecimento específico dos lipossomas apenas pelas células tumorais (CONEY et al., 1991; PARKER et al., 2005).

O sistema lipossomal pH-sensível desenvolvido por Rane e Prabhakar (2009) composto por Phospholipon 90G[®] (fosfatidilcolina), DOPE e CHEMS em uma razão molar de 8:2:2, respectivamente, demonstrou uma alta eficiência de encapsulação (94%) para o PTX, com liberação de 96% do conteúdo após exposição das vesículas a um pH igual a 5.

Nesse contexto, a encapsulação do PTX em um nanocarreador lipídico multifuncional combinando as três estratégias: circulação prolongada, pH-sensibilidade e o direcionamento ativo via receptor de ácido fólico, pode ser uma alternativa para aumentar a estabilidade, a eficácia terapêutica do PTX bem como reduzir a toxicidade e os efeitos adversos associados ao uso do Taxol[®]. Portanto, nessa etapa do estudo, o objetivo foi desenvolver e caracterizar lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada recobertos com folato contendo o PTX (LpHSFT-PTX), bem como avaliar sua citotoxicidade *in vitro* em linhagens tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e em linhagem de fibroblasto (L929).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

Diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 2000 e folato (DSPE-PEG-folato) foi fornecido pela Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG) e fosfatidilcolina de soja (SPC) foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Hemisuccinato de colestera (CHEMS) foi adquirida pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O PTX foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil). O ácido fólico (AF) foi adquirido pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O hidróxido de sódio (NaOH) e o cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos pela Vetec[®] Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O CrEL[®] foi adquirido da BASF (Ludwigshafen, Alemanha).

O clorofórmio foi adquirido pela Vetec[®] Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol e o álcool isopropílico foram fornecidos pela ISO FAR (Rio de Janeiro). O etanol desidratado e o ácido clorídrico (HCl) foram obtidos pela ProQuímios (Rio de Janeiro, Brasil).

Para os estudos de citotoxicidade *in vitro*, o meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) foi obtido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com glicose e L-glutamina foi adquirido da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EUA). O soro fetal bovino (SFB), metiltiazoltetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT), estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL foram adquiridos pela Gibco[®] Life Technologies (Carlsbad, EUA).

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas: MCF-7 e MDA-MB-231, adquiridas da ATCC e cedidas pela Prof^ª Dr^ª Mônica Cristina de Oliveira da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais; e L929 foi fornecida pela Prof^ª Dr^ª Helen Rodrigues Martins do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

2.1.2 Equipamentos

Para essa etapa do estudo foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica Mettler Toledo[®] (modelo 4k-15); centrífuga de bancada refrigerada Sigma[®] (modelo 4k-15); medidor de pH de bancada digital Tecnopom[®] (modelo mPA210); evaporador rotativo Fisaton[®] (modelo 801) acoplado à bomba de vácuo Prismatec[®] (modelo 131b); agitador de bancada do tipo vórtex Velp[®]; desruptor de células ultrassônico Unique[®] (modelo R2D091109); leitor de ELISA Molecular Devices SpectraMax Plus 384 UV/VIS acoplado ao *software* SoftMax[®] Pro 5.4; microscópio de força atômica Multimode e Dimension 300 monitorado por controlador Nanoscope IIIa; espectrofotômetro ALLCROM[®] (modelo o modelo UV-6300 PC), zetâmetro Zetasizer (modelo 3000HS) e ultracentrífuga Beckman Coulter Optima (modelo L-80).

2.2 Métodos

2.2.1 Desenvolvimento Farmacotécnico das Formulações Lipossomais

Diferentes preparações de lipossomas foram propostas a fim de alcançar uma formulação de LpHSF-PTX adequada em termos de diâmetro médio, índice de polidispersão, distribuição do tamanho das vesículas, potencial zeta e teor de encapsulação do PTX. Para isso, a etapa de desenvolvimento inicial da formulação foi realizada sem a adição do DSPE-PEG-folato em função do seu alto custo. Posteriormente, a partir da formulação escolhida, o DSPE-PEG-folato foi adicionado a esta em uma proporção de 0,5% para os estudos de estabilidade e atividade citotóxica. A composição lipídica, a razão molar e a concentração de PTX para cada formulação proposta encontram-se descritas na Tabela 7.

TABELA 7 – Composição lipídica, razão molar e concentração do PTX para as formulações propostas.

Composição	Razão Molar	Concentração Total de Lípide (mM)	Concentração de PTX (mg/mL)
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG	5,7:3,8:0,5	20	1,0
			2,0
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG	5,7:3,8:0,5	10	0,5
			1,0
			2,0
SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG	2,0:4,5:3,0:0,5	20	1,0
			2,0

DOPE: Dioleilfosfatidiletanolamina; CHEMS: Hemisuccinato de colesterila; DSPE-PEG: diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 2000; SPC: Fosfatidilcolina de soja.

Todas as formulações foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico, também conhecido como método de Bangham (Figura 13). Inicialmente, os lípides foram dissolvidos em clorofórmio e alíquotas dessas soluções, juntamente com a solução do PTX em clorofórmio, foram transferidas para um balão de fundo redondo. Em seguida, utilizando um evaporador rotativo e sob pressão reduzida o clorofórmio foi removido da mistura até a formação de um filme lipídico. Uma solução de NaOH 456 mM foi adicionada ao filme em quantidade suficiente para ionização do CHEMS e então o filme lipídico foi hidratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) e submetido a agitação vigorosa, em vórtex, até obtenção de uma dispersão homogênea de lipossomas MLV.

Posteriormente, a dispersão foi submetida à calibração do tamanho mediante sonicação, usando sonda de titânio, por um período de 5 minutos a uma potência de 100 W. Para isso, os lipossomas foram transferidos para um tubo de ensaio de vidro e adaptado em um recipiente com banho de gelo, para evitar o superaquecimento da dispersão durante o tempo de sonicação.

Em sequência, a fração de PTX não encapsulada nos lipossomas, insolúvel no meio, juntamente com possíveis partículas de titânio liberados pela sonda, foram separados mediante centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e a 4°C (SANTOS; CASTANHO, 2002; YANG et al., 2007a). O sobrenadante contendo o PTX encapsulado nos lipossomas foi então, cuidadosamente, separado e em seguida armazenado em geladeira a 4°C.

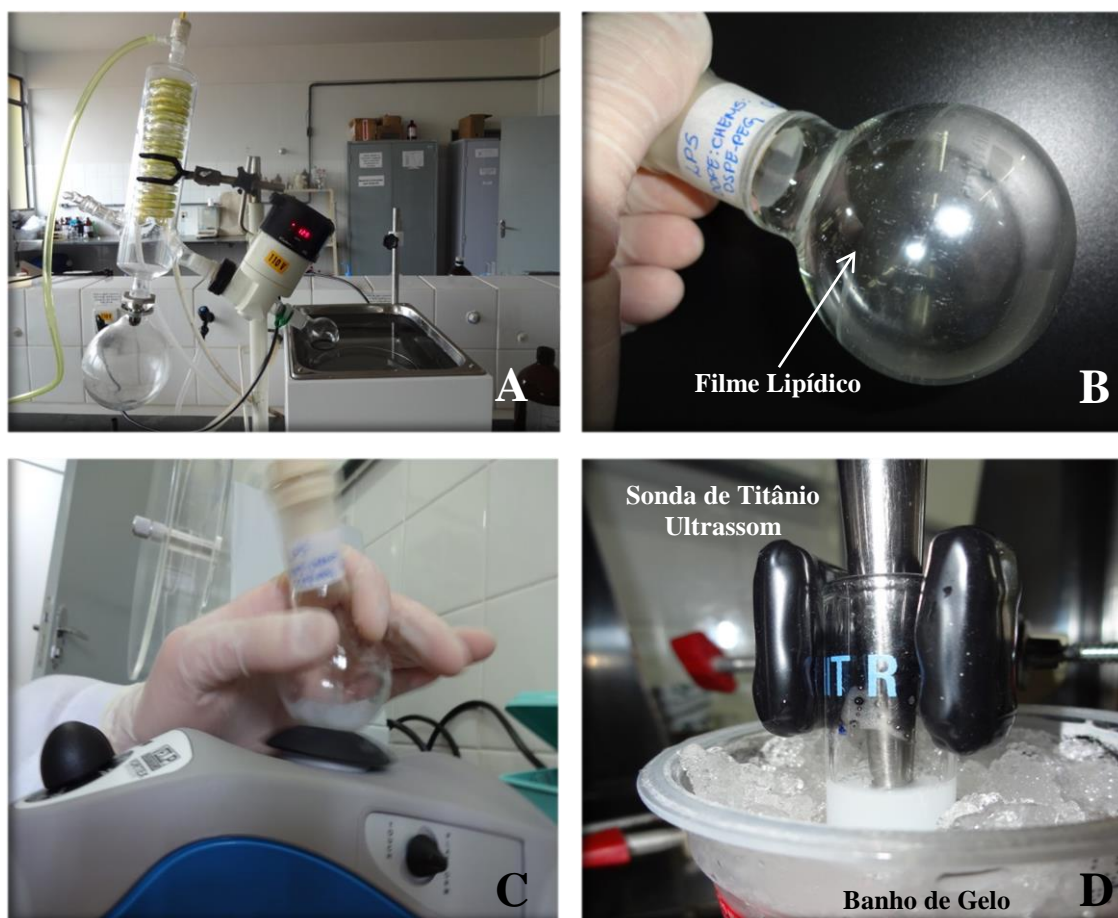


FIGURA 13 – Etapas de Preparação dos Lipossomas: (A) Remoção do clorofórmio por evaporador rotativo sob pressão reduzida. (B) Formação do filme lipídico. (C) Hidratação do filme lipídico. (D) Calibração do tamanho das vesículas por sonicação (Fonte: Próprio Autor).

2.2.2 Caracterização Físico-Química dos Lipossomas

2.2.2.1 Diâmetro Médio e Distribuição do Tamanho das Vesículas

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das vesículas (índice de polidispersão) foram determinados por PCS, a 25° C a um ângulo de 90°, utilizando um contador de partículas com raio laser monocromático (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Inglaterra). As diferentes formulações lipossomais foram diluídas 25 vezes em água Mili-Q, previamente filtrada em filtro de 0,45 μm , até que se obtivesse contagem adequada de

partículas. As determinações foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos como a média \pm DP.

2.2.2.2 Determinação do Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta das dispersões coloidais foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz associado à análise de mobilidade eletroforética das vesículas a um ângulo de 90° e à temperatura de 25°C utilizando o equipamento Zetasizer 3000HS. As amostras foram diluídas 250 vezes em solução de NaCl 0,9% (p/v). As determinações foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em com a média \pm DP.

2.2.2.3 Determinação do Teor de Encapsulação do PTX

O teor de encapsulação (TE) do PTX nos lipossomas foi determinado pelo método analítico de ED-UV, previamente validado como descrito no capítulo 1. Inicialmente, as vesículas lipossomais foram rompidas usando álcool isopropílico numa proporção equivalente a 1:3 (LEITE et al., 2012a), e posteriormente, a preparação foi diluída em metanol. A quantificação do PTX foi determinada nos lipossomas antes (lipossomas não purificados (Lps. Total)) e após a centrifugação (lipossomas purificados (Lps. Purificado)). O TE do PTX, foi então calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TE = ([PTX]_{Lps.Purificado} / [PTX]_{Lps.Total}) \times 100.$$

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão e as determinações realizadas em triplicatas.

2.2.3 Análise da Organização Supramolecular

A análise da organização supramolecular dos lipossomas foi realizada utilizando a técnica de SAXS. Para esses estudos, foram preparados lipossomas contendo PTX e lipossomas brancos das seguintes composições e razões de lípides:

- DOPE:CHEMS:DSPE-PEG (5,7:3,8:0,5)
- SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG (2,0:4,5:3,0:0,5)

As análises de SAXS foram realizadas usando os *pellets* dos lipossomas. Assim, após o processo de preparação dos mesmos como descrito no item 2.2.1, 1mL de cada formulação foi submetida à ultracentrifugação a 150.000 x g por 90 minutos a 4°C em ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-80 (Indianápolis, EUA). Em seguida o sobrenadante foi descartado e um volume de solução de NaCl 0,9% (p/v) ou meio RPMI, ambos em pH 7,4 ou 5,0, igual ao do sobrenadante, foi novamente adicionado aos *pellets*. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex, para a ressuspensão dos lipossomas e, em seguida, foram submetidas, novamente à ultracentrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas. Finalmente, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* das amostras reservados para análises por SAXS (Figura 14).

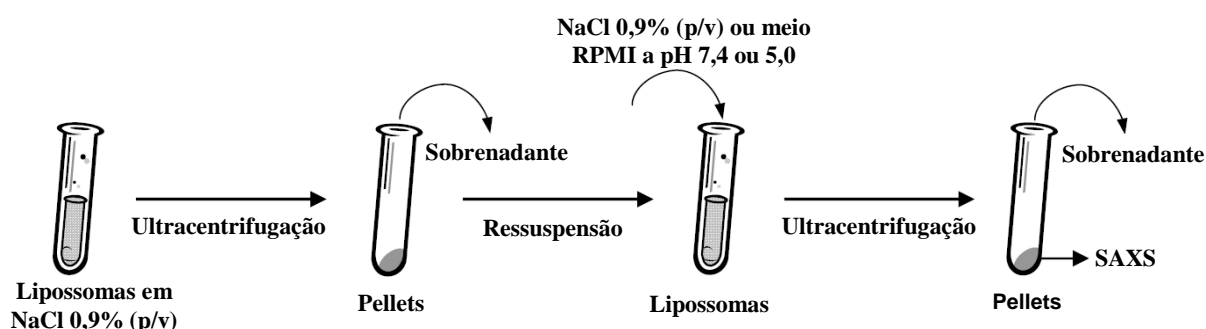


FIGURA 14 – Processo de preparo das amostras dos lipossomas utilizadas nas análises por SAXS.

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas (SP), na linha D1B-SAXS-1. Foi utilizado um comprimento de onda

fixo ($\lambda = 1,488$ nm). O detector Pilatus 100 k foi posicionado a 1 m da amostra e a região em espaço recíproco variou de $q_{\min} = 0,15 \text{ nm}^{-1}$ até $q_{\max} = 4,0 \text{ nm}^{-1}$. As amostras foram depositadas em anéis de metal, os quais foram vedados por um filme de poliimida (Kapton[®]) e acoplados a um sistema de aquecimento DSC-Linkam.

A fórmula utilizada para o cálculo das distâncias intermoleculares foi: $d = 2\pi/q$. Antes da análise das amostras, o substrato foi avaliado quanto a sua interferência nas medidas a serem realizadas e constatou-se que ele não contribuiu com nenhum pico de difração nas condições analisadas.

2.2.4 Avaliação da pH-sensibilidade

A liberação do PTX a partir dos lipossomas compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG foi avaliada em diferentes valores de pH a fim de confirmar a propriedade de sensibilidade frente às variações do pH. Inicialmente os lipossomas foram preparados como descrito no item 2.2.1 e alíquotas de 1mL de cada formulação foram adicionadas em oito diferentes tubos Falcon. Em seguida, utilizando um pHmetro e volume conhecido de HCl 0,01 M ou NaOH 0,01 M (ambos em solução de NaCl 0,9% (p/v)), o pH das formulações foi ajustado para os seguintes valores: 7,4; 7,2; 7,0; 6,8; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,0 e incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o PTX encapsulado nos lipossomas foi, cuidadosamente, separado do precipitado (fração de PTX liberada e insolúvel no meio). Finalmente, o sobrenadante foi diluído e submetido à quantificação por ED-UV. As análises foram realizadas em triplicatas e os valores expressos como a média \pm DP da porcentagem de retenção do PTX em relação à formulação inicial, ou seja, sem alteração do pH.

2.2.5 Análise Morfológica

A análise morfológica dos lipossomas foi realizada por microscopia de varredura por sonda mecânica, utilizando a técnica de AFM.

Essas análises foram realizadas em lipossomas contendo PTX e lipossomas brancos. Foram utilizados os equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa, do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente, operando em modo de contato intermitente (*tapping mode*), utilizando sondas de silício (*Nanosensors*) de comprimento de 228 μm , com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 a 10 nm.

Aproximadamente 10 μL de cada amostra foram depositados sobre a superfície de mica clivada no momento do uso. As amostras, logo após a deposição na superfície da mica, foram secas utilizando jatos de argônio. A varredura foi realizada com velocidade de 1 Hz e resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise (*Section Analysis*). Um mínimo de dez imagens de cada amostra foi analisado para assegurar reprodutibilidade dos resultados.

Os resultados foram expressos como a média \pm DP de 100 partículas analisadas.

2.2.6 Estudo de Estabilidade Preliminar

Foram preparados três lotes de lipossomas compostos por DOPE:CHEMS:DESPE-PEG:DSPE-PEG-folato na seguinte proporção 5,7: 3,8: 0,45: 0,05 em concentração total de lípides igual a 10 mM e 0,5 mg/mL de PTX, conforme descrito no item 2.2.1. Cada lote foi armazenado em frasco de vidro âmbar e mantido a 4°C. As formulações lipossomais foram caracterizadas nos períodos de tempos iguais a 0, 7, 15, 30, 60, 100 e 150 dias em termos diâmetro médio das vesículas, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de encapsulação como descrito no item 2.2.2 e o pH também foi monitorado nos diferentes tempos utilizando-se um pH-metro de bancada. Todos os resultados foram expressos como a média \pm DP.

2.2.7 Estudos de Citotoxicidade *in vitro*

2.2.7.1 Cultivo das Linhagens Celulares

Os estudos de atividade *in vitro* foram conduzidos contra células normais e neoplásicas. L929 (fibroblastos de rato) foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, glutamina 200 mM e antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL e penicilina 100 UI/mL). MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (v/v) e antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL e penicilina 100 UI/mL). Todas as culturas foram mantidas em garrafas de cultivo T75 em uma estufa umidificada em ambiente de 5% de gás carbônico (CO₂) a 37°C.

2.2.7.2 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio de Metabolização do Metiltiazoltetrazólico (MTT).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, baseado na redução do sal tetrazólio a cristais de formazan pela ação da enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis (MOSMANN, 1983). Alíquotas das células MCF-7 ($2,5 \times 10^4$ células/mL), MDA-MB-231 ($2,0 \times 10^4$ células/mL) ou L929 (1×10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços. As células foram pré-incubadas por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para permitir a adaptação antes da adição das formulações testadas.

Para o ensaio de citotoxicidade foram preparadas as seguintes formulações: lipossomas contendo PTX 0,5 mg/mL composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG (5,7:3,8:0,5) e sua respectiva formulação branco (sem PTX); lipossomas contendo PTX 0,5 mg/mL composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato (5,7:3,8:0,45:0,05) e sua respectiva formulação branco (sem PTX) e solução de PTX livre 6,0 mg/mL dissolvido em etanol desidratado:CrEL (1:1).

Seis grupos de tratamento foram avaliados, sendo: solução de PTX livre (PTX livre), lipossomas contendo PTX sem adição de folato (LpHS-PTX) e seu respectivo lipossoma branco (LpHS); lipossomas contendo PTX e folato (LpHSF-PTX) e seu respectivo lipossoma

branco (LpHSF) e o LpHSF-PTX com pré-tratamento com AF 1 mM (LpHSF-PTX + AF). Para o pré-tratamento com AF, 4 µL de solução de AF 50 nM em NaOH 0,01 M foram adicionados a cada poço, e então as placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, durante 1 hora, anteriormente ao tratamento.

As formulações contendo PTX foram adicionadas aos poços (20 µL) em concentrações de 500; 100; 20; 4; 0,8 e 0,16 nM de PTX.

Após o tratamento, as placas foram incubadas por 48 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Passado esse período, 20 µL de solução de MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, por 4 horas e então o meio foi removido e substituído por 200 µL de HCl 0,04 M em álcool isopropílico. A viabilidade celular foi estimada pela medida da taxa de redução do MTT, mediante avaliação da absorbância dos cristais de formazan, em comprimento de onda igual a 595 nm.

Os grupos controle foram constituídos por tratamento com LpHS, LpHSF, etanol desidratado:CrEL (1:1), AF 1 mM e um grupo mantido apenas com meio de cultura. Os valores de absorbância obtidos dos poços nos quais as células foram mantidas apenas no meio de cultura, sem tratamento, foram considerados como 100% de viabilidade celular para cálculo da porcentagem de alteração da viabilidade celular induzida pelos tratamentos. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle das células. Todas as amostras foram testadas em sextuplicata, em três experimentos independentes.

Posteriormente, a concentração de PTX necessária para promover 50% de inibição da viabilidade celular (IC₅₀) nas linhagens celulares estudadas foi determinada. O cálculo do índice de seletividade (IS) foi calculado mediante a seguinte equação:

$$IS = CC_{50} \text{ L929} / IC_{50} \text{ MCF-7 ou MDA-MB-231}$$

onde, CC₅₀ é a concentração citotóxica para a linhagem L929.

2.2.8 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos com média \pm desvio padrão. Para a verificação da normalidade e homocedasticidade da variância utilizou-se os testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas, quando adequadas, pelas equações: $y = \log \text{variável}$; $y = \log (\text{variável} + 1)$; $y = \text{raiz}$ ou $y = \text{raiz} (\text{variável} + 1)$. Os dados da caracterização físico-química, análise da pH-sensibilidade e estudo de estabilidade foram testados por ANOVA seguida de um pós-teste de Tukey. Os dados de diâmetro e altura dos lipossomas, obtidos através da AFM, foram comparados pelo teste t de *Student*. Para os dados dos experimentos de citotoxicidade *in vitro* realizou-se ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Um modelo de regressão não-linear foi utilizado para determinar os valores de IC50. Para todas as análises foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*, adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lipossomas têm mostrado grande aplicabilidade para a vetorização de fármacos antineoplásicos, como o PTX, em virtude de sua versatilidade e biocompatibilidade, além de melhorar a estabilidade, farmacocinética e biodistribuição dessa classe de medicamentos (CROSASSO et al., 2000; MAMOT et al., 2003; YANG et al., 2007a; BATISTA et al., 2007; ZHAO et al., 2012; KOUDELKA; TURÁNEK, 2012).

Dessa forma, o presente estudo buscou desenvolver uma formulação lipossomal multifuncionalizada para vetorização do PTX que possibilitasse ganhos em comparação ao Taxol[®] e que combinasse três estratégias: circulação prolongada, pH-sensibilidade e o direcionamento ativo via receptor de ácido fólico. O delineamento desse tipo de nanosistema exige considerações importantes em relação aos parâmetros químicos e físico-químicos, uma vez que, podem influenciar na estabilidade físico-química e nas propriedades biológicas *in vivo* e *in vitro* da formulação (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

3.1 Desenvolvimento Farmacotécnico das Formulações Lipossomais

3.1.1 Otimização da Etapa de Sonicação

A otimização de uma formulação lipossomal bem como a estabilidade da substância encapsulada podem ser influenciada por diversos parâmetros tais como: a composição e concentração dos lípides empregados, a concentração da substância encapsulada (razão lípide/fármaco), o meio de hidratação, o método de preparo, fatores mecânicos relacionados aos instrumentos utilizados na preparação, dentre outros (LAPINSKI et al., 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2006; FRÉZARD et al., 2005). Nesse sentido, no intuito de desenvolver uma formulação lipossomal na qual o PTX apresentasse boa estabilidade, elevado teor e características adequadas para futuras aplicações clínicas, inicialmente avaliou-se a influência dos parâmetros (concentração do PTX, da concentração e composição lipídica, o tempo e a energia da sonicação empregados no processo de calibração do tamanho das vesículas) nas características físico-químicas das formulações.

Após a análise de estudos envolvendo o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis para carrear diferentes moléculas bioativas e fármacos (SOARES et al., 2011; LEITE et al., 2012a; DE BARROS et al., 2013; LOPES et al., 2013), foi proposta, inicialmente, uma formulação lipossomal com composição lipídica DOPE:CHEMS:DSPE-PEG com razão molar igual a 5,7:3,8:0,5.

A etapa inicial do estudo consistiu na determinação do tempo mínimo de sonicação (energia fornecida ao sistema) necessário para a redução do tamanho das partículas. Foram preparados 4 mL de uma formulação de lipossomas branco constituídos por DOPE:CHEMS na proporção de (5,7:3,8), a qual foi submetida a diferentes condições de sonicação (Tabela 8). O diâmetro médio e índice de polidispersão das formulações foram avaliados em cada condição apresentada. Os resultados mostraram uma diminuição no diâmetro médio das vesículas à medida que houve aumento no tempo de sonicação, entretanto, a partir de 5 minutos (300 segundos) o índice de polidispersão da formulação voltou a sofrer um ligeiro aumento (Tabela 8). Diante disso, o tempo de 5 minutos e 20% da potência de 500 W foi selecionado para a calibração do tamanho das vesículas para os estudos subsequentes.

TABELA 8 – Condições para a padronização do tempo de sonicação necessário para a redução do tamanho dos lipossomas.

Potência (W) ^a	Tempo de Sonicação (s)	Energia fornecida ao sistema (J/mL) ^b	Diâmetro médio (nm)	IP ^c
20%	0	0	371,2	0,60
20%	30	750	180,1	0,36
20%	120	3000	140,6	0,32
20%	180	4500	138,0	0,27
20%	300	7500	125,5	0,28
20%	480	12000	123,3	0,31
20%	600	15000	120,2	0,31

^aA potência fornecida pelo sonificador Unique[®] é de 500 W. ^bA energia fornecida ao sistema foi calculada pela equação da energia ultrassônica $EA = (P \times T)/V$, onde, EA é energia fornecida ao sistema (J/mL), P é a potência utilizada (W), T o tempo de sonicação (s) e V é o volume da formulação (mL). ^cÍndice de Polidispersão.

3.1.2 Influência da Composição e Concentração Lipídica e Concentração de PTX

Inicialmente, formulações lipossomais constituídas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG com concentração lipídica total equivalente a 20 mM, concentrações de PTX igual a 1,0 e 2,0 mg/mL bem como formulações sem PTX foram preparadas. Os resultados da caracterização físico-química dessas formulações são mostrados na Tabela 9. Pode-se observar que a associação do PTX à membrana lipídica ocasionou um aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro das vesículas quando comparado à preparação sem PTX. Além disso, o aumento da concentração do fármaco também levou a um aumento do diâmetro médio. As formulações contendo PTX apresentaram índices de polidispersão superiores a 0,3, caracterizando sistemas heterodispersos (RAWAT et al., 2006), entretanto, esses valores só foram significativos para as formulações contendo PTX a 2,0 mg/mL em comparação às demais formulações.

Em relação ao teor de encapsulação, uma redução significativa ($p < 0,05$), de aproximadamente 38%, foi observada com o aumento da concentração de PTX de 1,0 para 2,0 mg/mL. Todas as formulações analisadas, contendo ou não PTX, apresentaram potencial zeta próximo da neutralidade.

TABELA 9– Diâmetro médio, índice de polidispersão, concentração de PTX encapsulada, teor de encapsulação e potencial zeta das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 20 mM contendo ou não PTX*.

Concentração inicial de PTX (mg/mL)	Diâmetro Médio \pm DP (nm)	Índice de Polidispersão \pm DP	Concentração de PTX encapsulada \pm DP (mg/mL)	Teor de Encapsulação \pm DP (%)	Potencial Zeta (ζ) \pm DP (mV)
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG					
-	124,9 \pm 2,4	0,25 \pm 0,003	-	-	+3,7 \pm 1,2
1,0	192,3 \pm 22,4 ^a	0,38 \pm 0,003	0,93 \pm 0,1	92,0 \pm 9,4	+1,2 \pm 2,4
2,0	259,0 \pm 13,9 ^{ab}	0,65 \pm 0,17 ^{ab}	1,2 \pm 0,2	56,8 \pm 3,8 ^b	+2,7 \pm 1,3
SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG					
-	114,0 \pm 6,8	0,24 \pm 0,02	-	-	-1,0 \pm 3,8
1,0	185,3 \pm 7,3 ^a	0,37 \pm 0,06	0,92 \pm 0,4	90,9 \pm 6,0	+3,8 \pm 1,2
2,0	384,0 \pm 43,7 ^{abc}	0,80 \pm 0,2 ^{ab}	1,73 \pm 0,3	83,7 \pm 3,2 ^c	+1,1 \pm 2,6

*Valores expressos com média \pm desvio padrão (n = 3). ^aRepresenta diferença significativa em relação aos lipossomas brancos. ^bRepresenta diferença significativa em relação a formulação de concentração inicial igual a 1,0 mg/mL. ^cRepresenta diferença significativa em relação a formulação com concentração inicial de PTX igual a 2,0 mg/mL e composição lipídica DOPE:CHEMS:DSPE-PEG 20 mM

Na busca pelo delineamento de uma formulação promissora para aplicabilidade clínica, uma consideração relevante é a maximização da razão entre a quantidade de fármaco encapsulado em relação à quantidade de substância lipídica usada (FRÉZARD et al., 2005). Isso reflete diretamente na quantidade de substância perdida durante o processo de produção, as quais, muitas vezes, não são passíveis de reaproveitamento, e na quantidade de substância lipídica a ser administrada ao paciente.

Dados da literatura têm mostrado que a inclusão de algumas moléculas lipídicas derivadas da fosfatidilcolina proporciona abertura de espaços na bicamada lipídica e possivelmente facilitam a acomodação de uma maior quantidade de substâncias na bicamada (ZHAO; FENG, 2005; KAN et al., 2011; KOUDELKA; TURÁNEK, 2012).

Dessa forma, foram desenvolvidas formulações lipossomais compostas por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG com a mesma concentração lipídica total e concentrações de PTX (Tabela 9).

Diferentemente da formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG, a inclusão da SPC promoveu um aumento significativo no teor de encapsulação para o PTX à medida que houve o aumento da concentração do mesmo para 2,0mg/mL ($p<0,05$). No entanto, embora ganhos no teor de encapsulação tenham sido verificados a associação de 2,0mg/mL de PTX promoveu o aumento significativo ($p<0,05$) no diâmetro médio das vesículas lipossomais, quando comparado com a formulação DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ para a mesma concentração do fármaco. Além disso, o índice de polidispersão obtido variou de 0,64 a 1,0. Valores do potencial zeta próximos da neutralidade, variando de -1,0 e +3,8 mV, foram obtidos em todas as formulações analisadas. Ao analisar a concentração de PTX 1mg/mL nas duas composições propostas, não se observou diferença nos parâmetros analisados (Tabela 9).

Pela análise de distribuição do tamanho das vesículas (Tabela 10) pode-se observar que as formulações sem PTX apresentaram aproximadamente 100% das vesículas com diâmetro inferior a 200 nm. No entanto, nas preparações contendo PTX, foi observada uma distribuição heterogênea do tamanho das vesículas quando comparada à formulação de lipossomas branco ($p<0,05$). É possível verificar ainda nas formulações contendo SPC e 2,0 mg/mL de PTX uma redução significativa na porcentagem de vesículas com diâmetro inferior a 300 nm acompanhada de aumento significativo no percentual de partículas com tamanho maior que 500 nm (aproximadamente 60%) em ambas as composições analisadas. Distribuição de tamanho semelhante foi observada em todas as faixas analisadas para as duas formulações (com e sem SPC) na concentração de PTX igual a 1,0 mg/mL.

TABELA 10– Distribuição de tamanho das vesículas das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 20 mM contendo ou não PTX*.

Concentração inicial de PTX (mg/mL)	Distribuição dos Tamanhos das Vesículas (%)			
	<200nm	<300nm	300 – 500nm	>500nm
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG				
-	96,7 ± 2,9	99,2 ± 0,6	0,5 ± 0,7	0,0
1,0	46,4 ± 6,6 ^a	51,8 ± 5,9 ^a	32,7 ± 5,8 ^a	15,5 ± 3,3 ^a
2,0	37,6 ± 3,8 ^{ab}	39,7 ± 2,7 ^a	1,4 ± 2,3 ^b	58,9 ± 4,8 ^{ab}
SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG				
-	98,6 ± 1,8	99,6 ± 0,6	0,4 ± 0,6	0,0
1,0	55,6 ± 7,9 ^a	66,7 ± 13,1 ^a	26,0 ± 7,9 ^a	7,3 ± 6,5
2,0	22,3 ± 10 ^{ab}	22,1 ± 2,0 ^{abc}	18,6 ± 15,1	59,5 ± 17,1 ^{ab}

*Valores expressos com média ± desvio padrão (n = 3). ^aRepresenta diferença significativa em relação aos lipossomas brancos. ^bRepresenta diferença significativa em relação a formulação de concentração inicial igual a 1,0 mg/mL. ^cRepresenta diferença significativa em relação a formulação com concentração inicial de PTX igual a 2,0 mg/mL e composição lipídica DOPE:CHEMS:DSPE-PEG 20 mM.

Outra estratégia para maximizar a relação entre fármaco encapsulado e quantidade de substância lipídica veiculada, bem como obter uma formulação que apresente uma maior proporção de partículas com tamanho menor que 300 nm, foi o preparo de formulações compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG com concentração lipídica total igual a 10 mM. Os resultados da caracterização físico-química dessas formulações podem ser visto na tabela 11. Em relação ao diâmetro médio das vesículas, a incorporação de PTX promoveu um aumento de aproximadamente 1,5, 2 e 3 vezes para as formulações com concentração inicial de PTX de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, respectivamente, quando comparado à preparação sem PTX. Não houve diferença significativa para o índice de polidispersão entre as formulações. Embora os valores de potencial zeta obtidos sejam superiores a 0,3 nas formulações sem PTX e contendo 0,5 mg/mL, estudos prévios tem demonstrando valores semelhantes ao se utilizar a técnica de sonicação para redução do tamanho das vesículas (HENEY et al., 2010). Potencial zeta com valores de cargas próximos da neutralidade foram novamente detectados..

Em relação ao teor de encapsulação do fármaco, o aumento da concentração inicial de PTX para 1,0 e 2,0 mg/mL promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) desse parâmetro em aproximadamente 25 e 40%, respectivamente, quando comparada com a formulação contendo 0,5 mg/mL de PTX. Em relação à distribuição do tamanho das vesículas, é possível verificar a presença de grupos heterogêneos em relação ao diâmetro quando há a associação com PTX, correlacionando com os valores do índice de polidispersão que foram maiores que 0,3. Entretanto, é possível perceber que, aproximadamente 90% das partículas da formulação com concentração inicial de PTX igual a 0,5 mg/mL, apresentavam diâmetro menor que 300 nm, o que não foi observado para as outras formulações (Tabela 12).

TABELA 11– Diâmetro médio, índice de polidispersão, concentração de PTX encapsulada, teor de encapsulação e potencial zeta das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE- PEG na concentração lipídica total de 10 mM contendo ou não PTX*.

Concentração inicial de PTX (mg/mL)	Diâmetro Médio \pm DP (nm)	Índice de Polidispersão \pm DP	Concentração de PTX encapsulada \pm DP (mg/mL)	Teor de Encapsulação \pm DP (%)	Potencial Zeta (ζ) \pm DP (mV)
-	132,8 \pm 11,8	0,34 \pm 0,13	-	-	-2,7 \pm 1,0
0,5	188,9 \pm 9,4 ^a	0,35 \pm 0,05	0,45 \pm 0,02	96,8 \pm 1,5	+2,7 \pm 2,2
1,0	257,0 \pm 54,0 ^a	0,40 \pm 0,17	0,73 \pm 0,1	71,9 \pm 6,4 ^b	+4,1 \pm 1,0
2,0	389,2 \pm 153,5 ^{ab}	0,67 \pm 0,31	1,27 \pm 0,2	60,9 \pm 9,8 ^b	+3,6 \pm 2,0

*Valores expressos com média \pm desvio padrão ($n = 3$). ^aRepresenta diferença significativa em relação aos lipossomas brancos. ^bRepresenta diferença significativa em relação a formulação de concentração inicial de PTX igual a 1,0 mg/mL.

TABELA 12– Distribuição de tamanho das vesículas das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 10 mM contendo ou não PTX*.

Concentração inicial de PTX (mg/mL)	Distribuição dos Tamanhos das Vesículas (%)			
	<200nm	<300nm	300 – 500nm	>500nm
-	100 ± 0	100 ± 0	0	0
0,5	72,2 ± 9,5 ^a	91,3 ± 8,9 ^a	6,8 ± 5,4	2,0 ± 3,4
1,0	21,3 ± 8,4 ^{ab}	26,0 ± 9,8 ^{ab}	42,9 ± 16,2 ^{ab}	30,5 ± 23,4 ^{ab}
2,0	16,2 ± 5,2 ^{abc}	18,4 ± 6,2 ^{ab}	23,2 ± 26,5 ^{ab}	58,4 ± 32,5 ^{ab}

*Valores expressos com média ± desvio padrão (n = 3). ^aRepresenta diferença significativa em relação aos lipossomas brancos. ^bRepresenta diferença significativa em relação a formulação de concentração inicial de PTX igual a 0,5 mg/mL. ^cRepresenta diferença significativa em relação a formulação com concentração inicial de PTX igual a 1,0 mg/mL.

Teoricamente, taxas de encapsulação próximas de 100% podem ser obtidas com substâncias lipofílicas, uma vez que são incorporadas na bicamada dos lipossomas (FRÉZARD et al., 2005), como é o caso da molécula do PTX. Porém esses valores podem variar de acordo com a composição quali e quantitativa dos lípides, bem como o método de preparo escolhido.

Tem sido relatado que a capacidade máxima de encapsulação para o PTX em formulações lipossomas situa-se em torno de 3 a 4% em mol da composição, e, à medida que aumenta a concentração inicial desse fármaco há uma perturbação da estrutura da bicamada da qual o PTX é forçado para fora (KOUDELKA et al., 2010; KAN et al., 2011). Possivelmente, isso pode ter acontecido com as formulações compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG, onde houve redução no teor de encapsulação à medida que a concentração inicial do PTX era aumentada. No entanto, alguns lípides insaturados e lisolípides em função da forma estrutural que apresentam, aliado a baixa temperatura de transição de fase, proporcionam aumento da fluidez da bicamada lipídica, criando novos espaços conhecidos como “bolsas”, nas quais a molécula hidrofóbica do PTX pode se acomodar e promover o aumento de seu teor de encapsulação (KAN et al., 2011; KOUDELKA; TURÁNEK, 2012).

Considerando as formulações onde a SPC foi incluída em sua composição, ao aumentar a concentração inicial do PTX para 2,0 mg/mL não foi observada uma redução significativa no teor de encapsulação para o fármaco. Dessa forma, possivelmente, essas

“bolsas” podem ter sido criadas pelas moléculas de SPC por ser um lipíde que apresenta em sua cadeia acil quatro insaturações (Figura 15), possibilitando um teor de encapsulação para o PTX relativamente alto, quando há o aumento da concentração inicial desse fármaco.

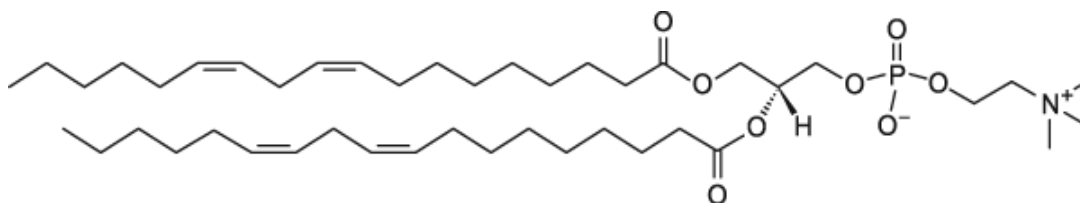


FIGURA 15 – Estrutura química da Fosfatidilcolina de soja (SPC) (AVANTI, 2014). Disponível em <<http://avantilipids.com/>>.

Resultados semelhantes com teor de encapsulação para o PTX em torno de 90% foram obtidos por Rane e Prabhaker (2009) durante o desenvolvimento de formulações lipossomais pH-sensíveis pelo método de hidratação do filme lipídico com solução de dextrose 5% (p/v), com composições lipídicas equivalentes a SPC:DOPE:CHEMS (8:2:2) e calibração do tamanho das vesículas por sonicação. Em outro estudo, utilizando o mesmo método de produção, entretanto com meio de hidratação distinto, Heney e colaboradores (2010) também conseguiram altos teores de encapsulação para esse fármaco, aproximadamente 96%, com formulações que combinavam dimiristoilglicerolfosfatilcolina (DMPC) e DPPC, e DMPG.

As alterações físicas como agregação das vesículas, fusão entre bicamadas lipídicas e extravasamento de fármacos são fatores que afetam a vida útil de uma formulação lipossomal (MORA-HUERTAS et al., 2010). A importância de determinar o potencial zeta nas amostras lipossomais está na possibilidade de inferir tanto sobre a estabilidade físico-química, no reconhecimento e distribuição das vesículas na circulação sanguínea quanto na interação entre os lipossomas e os fármacos neles carregados (ULRICH, 2002).

O potencial zeta para todas as formulações desenvolvidas situou-se em torno da neutralidade. Esses achados podem ser justificados pela presença do PEG₂₀₀₀ na composição dos lipossomas. As cadeias longas desse polímero exercem efeitos sobre as cargas superficiais dos lipossomas, neutralizando-as (HASHIZAKI et al., 2003; MOMEKOVA et al., 2007) e, juntamente com sua resistência hidrodinâmica, confere às vesículas pouca mobilidade

eletroforética, no campo elétrico aplicado, implicando em potencial zeta próximo à neutralidade (DE BARROS et al., 2013).

De uma forma geral, a fronteira entre sistemas coloidais estáveis e não estáveis é definido com valor de potencial zeta igual a ± 30 mV. Sistemas com valores de potencial zeta acima de +30 mV e abaixo de -30 mV são considerados mais estáveis devido às forças de repulsão eletrostática entre as partículas (MORA-HUERTAS et al., 2010). A presença do PEG é capaz de formar uma densa “nuvem conformacional” em torno da superfície das vesículas e proporcionar o efeito de impedimento estérico desfavorecendo os fenômenos de agregação (ISHIDA et al., 2002; KIM et al., 2009).

Os resultados de potencial zeta encontrados no presente trabalho mostram concordância com os obtidos para lipossomas contendo PTX desenvolvidos por Koudelka e colaboradores (2010) com valores próximos a -7,0 mV. Embora com composição lipídica diferente, o PEG₂₀₀₀, associado aos fosfolípides, estava presente na formulação em 5%. Outros estudos envolvendo a mesma proporção e composição lipídica das formulações empregadas nesse trabalho, com presença do PEG₂₀₀₀ em 5%, porém carreando outros fármacos, mostraram valores de potencial zeta entre +2,3 e -1,6 mV (DE BARROS et al., 2013; LOPES et al., 2013; LEITE et al., 2012a).

Além disso, tem sido demonstrado que partículas carregadas podem ser eliminadas mais rapidamente da circulação sanguínea. Ao passo que, sistemas constituídos por fosfolípides peguילים proporcionam a capacidade de evitar o reconhecimento das vesículas pelas células do SFM promovendo o aumento no tempo de circulação no sangue e melhor biodistribuição das mesmas (ISHIDA et al., 2001; ISHIDA et al., 2002). A combinação das propriedades de circulação prolongada e prevenção de fenômenos de agregação das vesículas têm sido conseguidas com a utilização do PEG entre 5 a 10% da composição lipídica de formulações lipossomais (MOMEKOVA et al., 2007; WOODLE, 1995). Dessa forma, pelos resultados de potencial zeta evidenciados espera-se que a formulação pretendida possa apresentar estabilidade de prateleira e propriedades biológicas adequadas.

O diâmetro das vesículas lipossomais é outro parâmetro extremamente relevante para o carregamento de agentes antitumorais. Embora o sistema proposto no presente trabalho caracterize um sistema multifuncionalizado, é importante considerar que tais sistemas também tendem a se acumular nos tecidos tumorais devido ao efeito EPR. Como previamente relatado, esse efeito é decorrente de diferenças anatômicas entre tecidos normais e tumorais. É bastante conhecido que as formulações lipossomais usadas com a finalidade de carrear antineoplásicos devem apresentar, em média, vesículas pequenas para melhor eficácia terapêutica e cumprir

requisitos de segurança e ao paciente, uma vez que lipossomas com diâmetro acima de 5 μm entrando na circulação sanguínea podem desencadear quadros de embolia (ANTUNES, 2004; TORCHILIN, 2005). As partículas de tamanho entre 100 e 150 nm têm o acúmulo preferencial na região tumoral devido o efeito EPR (TORCHILIN, 2005), entretanto, em função da angiogênese defeituosa, os poros existentes nas paredes dos vasos da região tumoral podem permitir a passagem dos lipossomas de até 400 nm de diâmetro (FERREIRA et al., 2013). Assim, para garantir o extravasamento eficiente dos lipossomas por estas fenestrações esses devem apresentar diâmetro muito menor que 400 nm (DANHIER et al., 2010).

Todas as formulações analisadas apresentaram diâmetro médio inferior a 400 nm, no entanto, pôde-se observar um aumento significativo do diâmetro médio das vesículas associado ao aumento da quantidade de fármaco (Tabela 10). Esse fato pode ser explicado pelas características da molécula do PTX, a qual é altamente lipofílica e volumosa tendendo-se a acomodar na bicamada dos lipossomas (KOUDELKA; TURÁNEK, 2012). Ao ser incorporado na bicamada, o PTX, por ser uma molécula com grande volume, necessita de mais espaço para se acomodar e assim “empurra” as moléculas lipídicas umas contra as outras, promovendo expansão das mesmas, principalmente de lípides insaturados que são mais compressíveis e menos rígidos (ZHAO; FENG, 2005), possibilitando, dessa forma, o aumento no diâmetro das vesículas à medida que há o aumento da encapsulação do PTX.

No presente estudo, embora as formulações contendo PTX não tenham apresentado índices de polidispersão inferiores a 0,3, característicos de sistemas monodispersos (RAWAT et al., 2006), os melhores índices encontraram-se na fronteira desse valor para preparações com concentração de fármaco menor ou igual a 1,0 mg/mL. Possivelmente, a explicação para a dificuldade de obter formulações com índices de polidispersão inferiores a 0,3, pode estar relacionada com a distribuição bimodal das populações das vesículas obtidas por sonicação, verificado principalmente com sonicação moderada (WOODBURY et al., 2006; LAPINSKI et al., 2007). Esse método utiliza a energia acústica, principalmente por meio de uma sonda, para promover o rompimento das vesículas maiores em vesículas menores, podendo estas ser uni ou multilamelares. Dessa forma, há grande variabilidade no tamanho final dos lipossomas podendo apresentar populações de diâmetros distintos, umas mais expressivas que a outra, refletindo assim em um sistema polidisperso (WOODBURY et al., 2006).

Diante disso, a análise de distribuição de tamanho de partículas torna-se extremamente importante. No presente estudo, a formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG de concentração lipídica total a 10 mM e concentração inicial de PTX igual a 0,5 mg/mL

mostrou melhor distribuição de tamanho das vesículas quando comparado as demais formulações. Como mencionado, cerca de 91% das vesículas apresentavam diâmetro inferior a 300 nm e apenas 2% com diâmetro superior a 500 nm, sendo o maior tamanho observado de aproximadamente 600 nm. Por apresentar características adequadas de tamanho, distribuição e ainda um IP próximo de 0,3 essa formulação foi a escolhida para os estudos subsequentes.

3.2 Análise Preliminar da Organização Supramolecular

Nesse estudo, a análise da organização supramolecular dos lipossomas compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG foi realizada pela técnica de SAXS, no intuito de investigar modificações no padrão de organização das fases lamelares e não lamelares dos lipossomas em função da composição lipídica. Dados da literatura têm demonstrado que é possível induzir transições não lamelares isotermicamente a partir de pequenas mudanças nas condições físico-químicas tais como pH, hidratação e concentração de sais (SEDDON, 1990).

Inicialmente, foi investigado o efeito do pH (7,4 e 5,0) sobre a organização supramolecular das moléculas de DOPE nos lipossomas compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX. Os difratogramas de SAXS foram adquiridos em temperatura de 30°C. Para todos os experimentos a periodicidade das reflexões de Bragg foi calculada por intermédio da fórmula $d = 2\pi/q$. Na Figura 16 estão apresentados os espectros de SAXS das amostras preparadas em solução de NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 e em pH 5,0. Para as amostras em pH 7,4 é possível constatar a presença de três picos bem definidos localizados em q iguais a 0,657; 1,332 e 1,991 nm⁻¹, os quais correspondem a espaçamentos de rede (d) iguais 9,56; 5,71 e 4,71 nm com razões de reflexão de Bragg, em torno de 1, 2 e 3, indicando a organização das moléculas de DOPE numa fase lamelar.

Pela análise do difratograma dessa mesma amostra preparada em NaCl 0,9% (p/v) pH 5,0 é possível perceber mudanças estruturais significativas em relação à amostra em pH 7,4. Observa-se um pico em q igual a 0,606 para o qual não se encontrou associação. Um domínio que compreende os picos localizados em q iguais a 0,851; 1,2058; 1,4338 e 1,7548 nm⁻¹ para os quais foram identificadas razões de reflexões de Bragg iguais a 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$ e 2, indicando, a organização das moléculas de DOPE em fase cúbica. Estudos prévios utilizando difração de raio-X dispersiva de energia (EDXD) têm demonstrado um perfil de organização estrutural

semelhante para lipossomas brancos compostos por DOPE:CHEMS nos mesmos valores de pH analisados (SILVA et al., 2011).

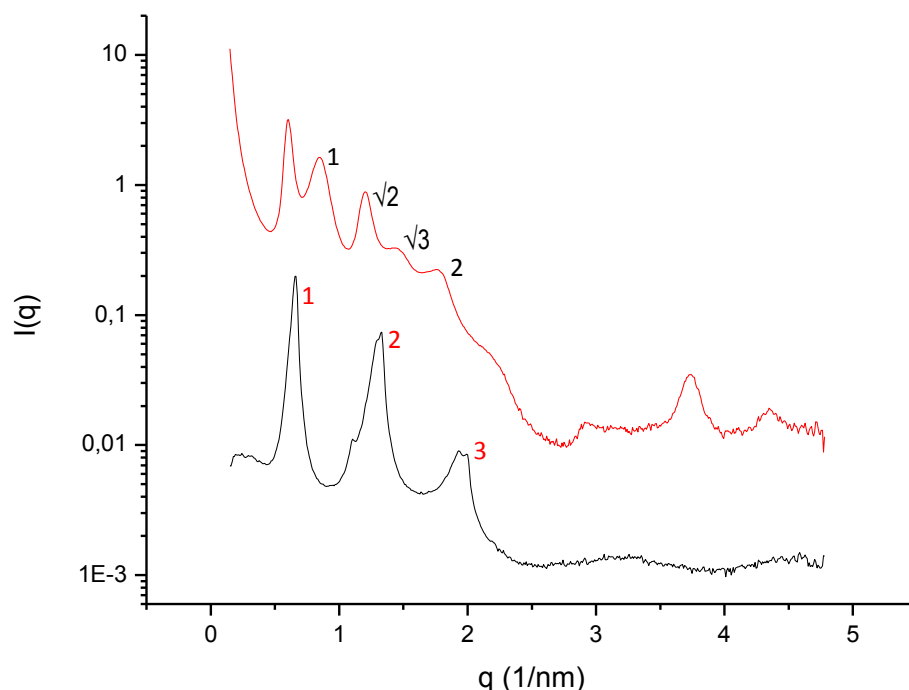


FIGURA 16 – Espectro de SAXS obtidos para os lipossomas DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 (preto) e 5,0 (vermelho). Os índices representados nos picos correspondem a padrões de reflexão de Bragg para fases lamelar (vermelho) e cúbica (preto).

Os espectros de SAXS para as formulações compostas por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG branco e com PTX preparadas em NaCl 0,9% pH 7,4 e 5,0 estão apresentados na figura 17. Foi possível observar vários picos em diferentes valores de q , no entanto, não foram detectados domínios característicos de razões de reflexão de Bragg. Razões incompletas sugestivas de fase lamelar foram obtidas, porém outros estudos precisam ser conduzidos para confirmar essa hipótese. Para a formulação de lipossomas branco, apenas o espectro da formulação preparado em NaCl 0,9% (p/v) pH 5,0 foi apresentado, uma vez que o mesmo perfil foi obtido para ambos valores de pH analisados. Pelo difratograma, pode-se verificar picos em q iguais a 0,530 e 1,062 nm⁻¹, os quais correspondem a espaçamentos de rede iguais a 11,8 e 5,9 nm, indicando reflexões de Bragg em torno de 1 e 2 e sugerindo a organização das moléculas de DOPE na fase lamelar (Figura 17). Essa formulação também foi avaliada em meio de cultura RPMI pH 7,4 e 5,0 (Figura 18). Em pH 7,4 dois domínios

foram detectados. O primeiro, considerando os picos em q igual a 0,6737; 1,3156 e 2,0082 nm^{-1} com espaçamentos de rede iguais a 9,33; 5,52 e 3,13 nm. O segundo correlacionando os picos em q igual a 1,1382; 2,2784 e 3,7312 nm^{-1} , os quais correspondem a espaçamentos de rede iguais a 5,52; 2,75 e 1,83 nm. Ambos os domínios caracterizam um padrão de reflexão de Bragg em torno de 1, 2 e 3 demonstrando organização molecular da DOPE em fase lamelar. Em pH 5,0 foram localizados picos em q iguais a 1,4929; 2,9119 e 4,3647 nm^{-1} para os quais foram identificados razões de reflexões de Bragg em torno de 1, 2 e 3 demonstrando ausência de alteração mesmo após redução do pH. Com o intuito de confirmar se esse efeito era decorrente da presença do PTX na bicamada, lipossomas branco em pH 5,0 também foram avaliados (Figura 18). Nessas amostras, pode-se localizar dois picos em q igual a 0,547 e 1,104 nm^{-1} correspondentes a espaçamento de rede iguais a 11,48 e 5,69 nm e razões de reflexão de Bragg 1 e 2.

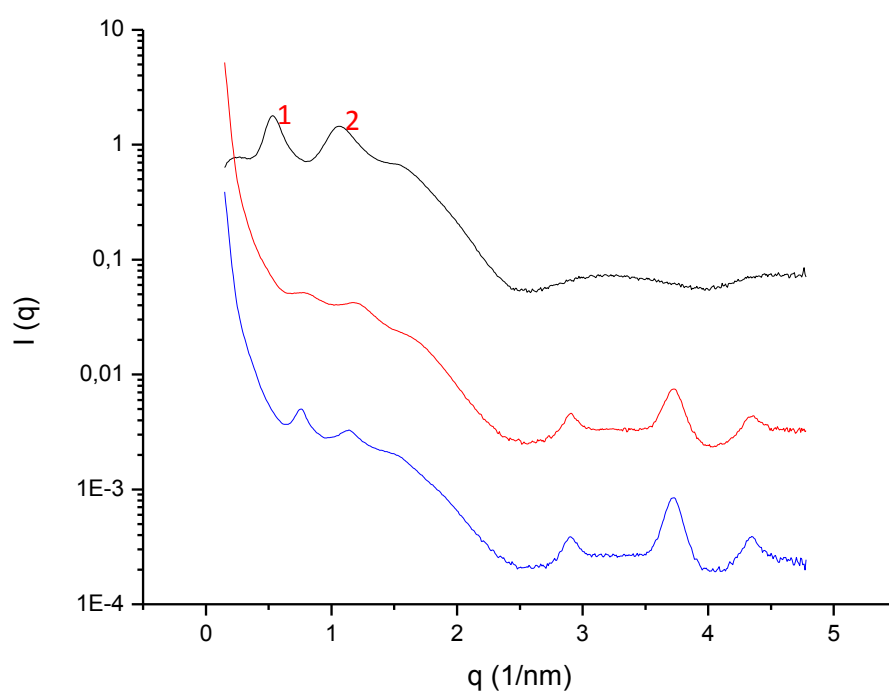


FIGURA 17 – Espectro SAXS dos lipossomas compostos por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX (vermelho e azul) e branco (preto) preparados em solução de NaCl 0,9% (p/v). Os índices representados nos picos correspondem a padrões de reflexão de Bragg para fase lamelar (vermelho).

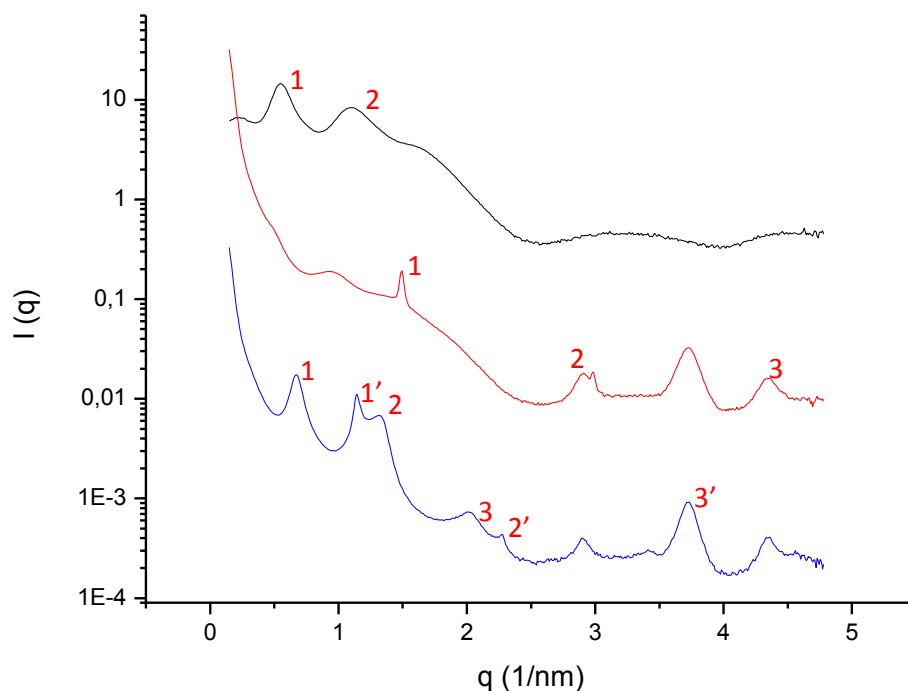


FIGURA 18 - Espectro SAXS dos lipossomas compostos por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG contendo PTX (vermelho e azul) e branco (preto) preparados em meio RPMI. Os índices representados nos picos correspondem a padrões de reflexão de Bragg para fase lamelar (vermelho)

Como já mencionado, em contraste com a maioria dos outros fosfolípides, a PE e seus derivados apresenta uma cabeça polar pouco hidratada que ocupa um menor volume quando comparado com sua cadeia de hidrocarbonetos exibindo uma forma de cone para suas moléculas. Esse tipo de organização das moléculas da PE favorece a formação de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio) entre os grupamentos amina e fosfato da região polar desse fosfolípide, que implica na tendência dessas moléculas em adquirir a fase hexagonal invertida acima da temperatura de transição de fase, impossibilitando a formação de vesículas. Logo, para que as vesículas lipossomais possam ser formadas, é necessária a intercalação de moléculas anfifílicas que contêm um grupo ácido protonável, e que sejam negativamente carregados em pH fisiológico. A sucessiva aproximação dessas moléculas, como é o caso do CHEMS, constitui a base para o mecanismo da pH-sensibilidade. A carga negativa da molécula anfifílica proporciona uma repulsão eletrostática entre essa molécula e o grupo fosfato do lípide estabilizando-as, proporcionando assim a formação das vesículas que se encontram na fase lamelar (SIMÕES et al., 2004; KARANTH; MURTHY, 2007; FERREIRA et al., 2013).

A análise por SAXS dos lipossomas compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG em solução de NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 mostrou razões de reflexão de Bragg correspondendo a fase lamelar dos lipossomas, confirmando tal dinâmica de estabilização entre as moléculas de DOPE e CHEMS e, conseqüentemente, a formação das vesículas lipossomais. Em solução de NaCl 0,9% (p/v) a pH 5,0, a acidificação desencadeia a protonação dos grupos carboxílicos do CHEMS reduzindo seu efeito estabilizador, caracterizando a desestabilização da bicamada lipídica e o aparecimento de fases não lamelares. Embora o PTX apresente alta lipofilia e alta afinidade pela bicamada lipídica, esses resultados demonstram que a presença do fármaco não impede o aparecimento de fases não lamelares da DOPE em pH 5,0, sugerindo que não há alteração em relação a propriedade de pH-sensibilidade da vesículas.

Não há relatos na literatura de estudos envolvendo análise por SAXS para formulações lipossomais pH-sensíveis carreando o PTX. Como previamente relatado, Silva e colaboradores (2011) durante o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis compostos por DOPE e CHEMS (6:4) para veicular um complexo formado por DNA plasmideal e ciclodextrina, avaliaram a organização supramolecular das vesículas pela técnica de EDXD. Foi verificado que, os lipossomas em tampão com pH igual a 7,4 apresentaram padrões de reflexão de Bragg caracterizando estruturas em fase lamelar. Em pH 5,0, as análises por EDXD revelaram padrões de reflexão de Bragg que correspondiam a fase hexagonal, mostrando assim, a transição da fase lamelar para a hexagonal, em função da redução do pH em favorecimento da ionização do CHEMS, que promove a desestabilização das vesículas.

Por outro lado, independente do pH analisado, todas as formulações contendo SPC na composição, com ou sem PTX, apresentaram razões de reflexão de Bragg indicativas de organização supramolecular das moléculas da DOPE em fase lamelar. Diante desses resultados pode-se inferir que, possivelmente, a presença de SPC na bicamada esteja conferindo maior estabilidade ao sistema impedindo a transição para fases hexagonal e cúbica em pH mais baixo. Esses achados poderão resultar em redução da pH-sensibilidade do sistema, o que poderá comprometer o objetivo da formulação proposta. Dados da literatura têm sugerido que a presença de SPC na bicamada lipídica em associação com DOPE realmente ocasiona uma redução da pH-sensibilidade dos sistemas corroborando os dados descritos acima (ISHIDA et al., 2006).

3.3 Avaliação da pH-sensibilidade

Com base nos resultados de difração de raio-X e no intuito de avaliar a pH-sensibilidade das formulações nas diferentes composições lipídicas, os sistemas foram submetidos a alterações de pH (7,4 a 5,0). Os resultados do estudo de pH-sensibilidade estão mostrados na figura 19.

À medida que o pH é gradativamente diminuído, o PTX é liberado das vesículas lipossomais em ambas formulações analisadas. Entretanto, é possível perceber que, a partir do pH 6,8 a formulação contendo DOPE:CHEMS:DSPE-PEG tem uma liberação maior de PTX ($p < 0,05$), chegando a liberar quase 30% a mais do fármaco em pH equivalente a 5,0 ($p < 0,05$), em comparação com a formulação contendo SPC em sua composição.

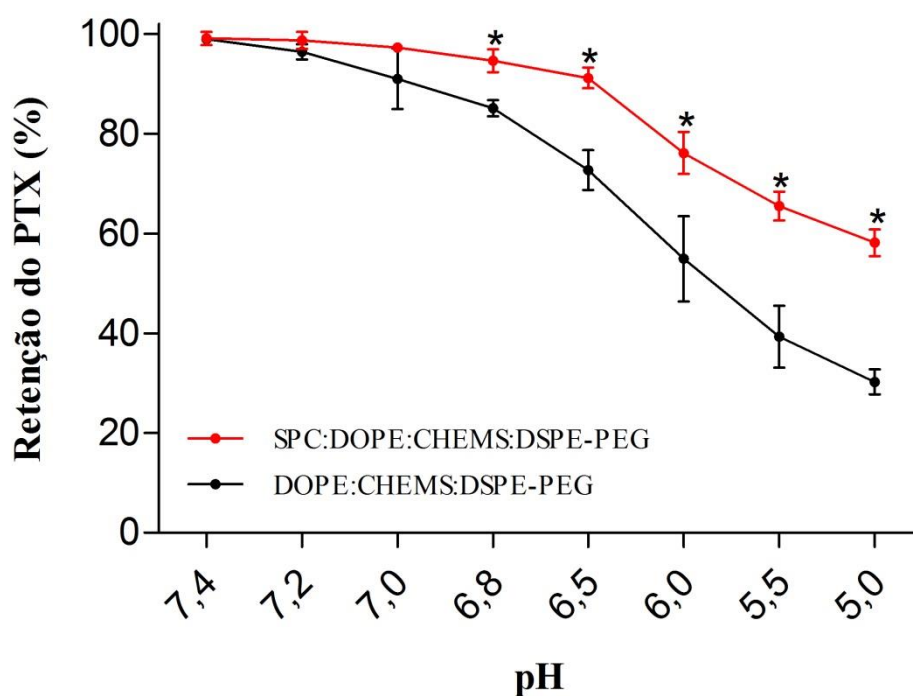


FIGURA 19 – Perfil de retenção do PTX (%) em diferentes valores de pH. (*) Representa diferença significativa entre as formulações considerando o mesmo pH analisado. DOPE: Dioleilfosfatidiletanolamina; CHEMS: Hemisuccinato de colesterol; DSPE-PEG: diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol 2000; SPC: Fosfatidilcolina de soja.

Além disso, considerando o pH inicial igual a 7,4, a liberação do fármaco foi significativamente diferente a partir do pH 6,8 para a formulação sem SPC ($p < 0,05$) e, a partir do pH 6,0 para a formulação contendo SPC ($p < 0,05$).

A um pH igual a 5,0, foi possível perceber que, apenas cerca de 30% do PTX ficou retido nas vesículas da formulação lipossomal, indicando boa liberação do fármaco à medida que o pH decai. Essa taxa de liberação pode ser favorável à entrega de droga que atua no interior das células, como é o caso do PTX, pois, uma vez internalizados, os lipossomas podem ser direcionados aos endossomas, os quais criam, na fase tardia, um ambiente onde o pH pode chegar a valores entre 6,0 e 5,0 (KARANTH; MURTHY, 2007).

A avaliação da pH-sensibilidade das formulações corrobora os dados obtidos por SAXS, sugerindo uma possível alteração da pH-sensibilidade em função da redução da razão molar da DOPE após incorporação de SPC. Ishida e colaboradores (2006), durante o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis contendo doxorrubicina, investigaram o efeito da fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) e Chol sobre a pH-sensibilidade das vesículas. Para esse estudo foi realizado uma série de testes, variando o pH do meio estudado em uma faixa de 7,5 a 4,5, sendo considerados como controles positivo e negativo as formulações compostas por DOPE:CHEMS (6:4) e HSPC:Chol (2:1), respectivamente. A formulação composta por DOPE:HSPC:CHEMS:Chol na proporção de (3:3:2:2) não mostrou pH-sensibilidade em função da acidificação do meio, pequena sensibilidade foi detectada quando a proporção dos lípides foi mudada para (4:2:2:2) e uma extensiva sensibilidade ao pH foi observada quando essa proporção era de (6:0:2:2), dessa forma, mostraram que a sensibilidade da formulação ao pH ácido é aumentada com o acréscimo da porcentagem molar de DOPE e diminuição de HSPC.

Essa possível diminuição da pH-sensibilidade pode ser atribuída ao fato da fosfatidilcolina (PC) apresentar áreas moleculares aproximadamente equivalentes para o grupo polar e sua cadeia de hidrocarboneto, que assumem uma estrutura molecular cilíndrica e leva a formação da fase lamelar, caracterizando bicamadas (Figura 20) (FATTAL et al., 2004). Dessa forma, possivelmente, pode haver uma estabilização da fase lamelar, pela presença da SPC juntamente com os outros lípides, mantendo a formação, em certa proporção, das vesículas mesmo com a diminuição do pH.

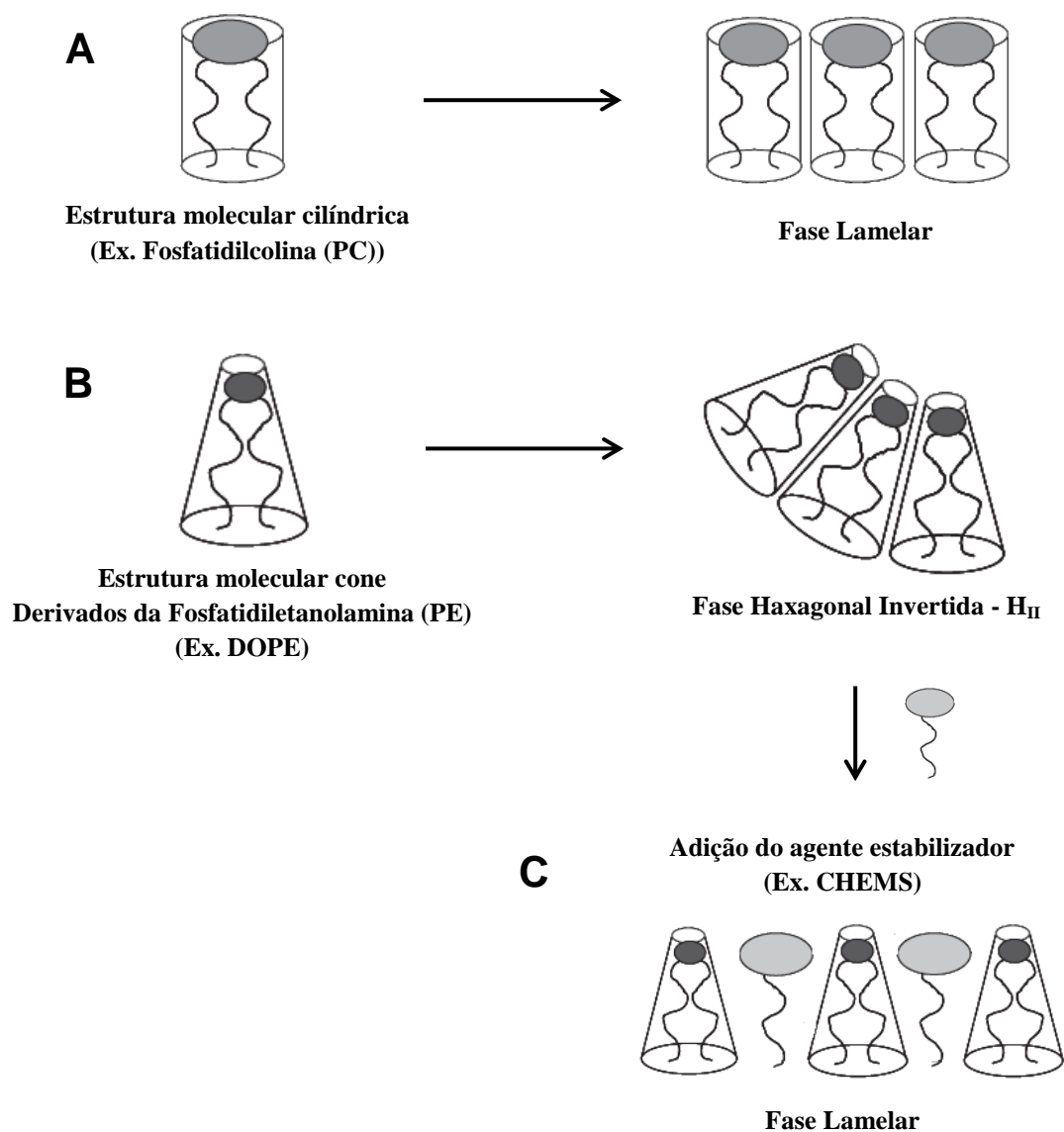


FIGURA 20 – Estruturas moleculares típicas de lípides e suas organizações: (A) Estrutura molecular do tipo cilindro característica dos derivados de fosfatidilcolina (PC) levando à organização lamelar. (B) Estrutura molecular do tipo cone característica dos derivados de fosfatidiletanolamina (PE) (Ex. DOPE) levando à organização hexagonal invertida (H_{II}). (C) Organização lamelar das moléculas de DOPE após estabilização na presença de CHEMS, em pH fisiológico (Adaptado de FATTAL et al., 2004).

3.4 Análise Morfológica

Para o desenvolvimento de formulações lipossomais é fundamental conhecer a forma, estrutura, morfologia e a distribuição de tamanho das vesículas para inferir sobre sua aplicabilidade no campo farmacêutico (RUOZI et al., 2007). Nesse contexto, a AFM foi utilizada para avaliar essas características nas formulações lipossomais. A mica foi utilizada como suporte para as amostras, por ser um mineral com plano basal e clivagem muito fácil apresentando superfície atômica plana. A superfície exposta é hidrofílica e apresenta cargas negativas.

Foram analisadas alíquotas das formulações de LpHS e a formulação de lipossomas contendo PTX a 0,5 mg/mL compostas por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração total de lípides igual a 10 mM.

A análise da formulação LpHS demonstrou a presença de vesículas com formato esférico e regular em um fundo liso, a superfície da mica, sem indicativo de possíveis agregados de vesículas, porém, com diâmetros heterogêneos, como pode ser visualizado na figura 21 (A e B).

A figura 22 mostra a distribuição de tamanho das vesículas obtida em contagem de 100 partículas para 10 diferentes campos. O diâmetro dos LpHS obtido por AFM variou de 70,3 a 213,2 nm, apresentando média equivalente a $128,3 \pm 33,7$ nm e a altura média igual a $14,5 \pm 1,3$ nm (Figura 23). A avaliação da relação diâmetro/altura demonstrou uma relação de $8,8 \pm 2,5$, sugerindo a presença de estruturas achatadas. Em relação ao diâmetro médio e o índice de polidispersão dessa mesma amostra obtida por PCS, seus valores foram $132,8 \pm 11,8$ nm e $0,34 \pm 0,13$, respectivamente.

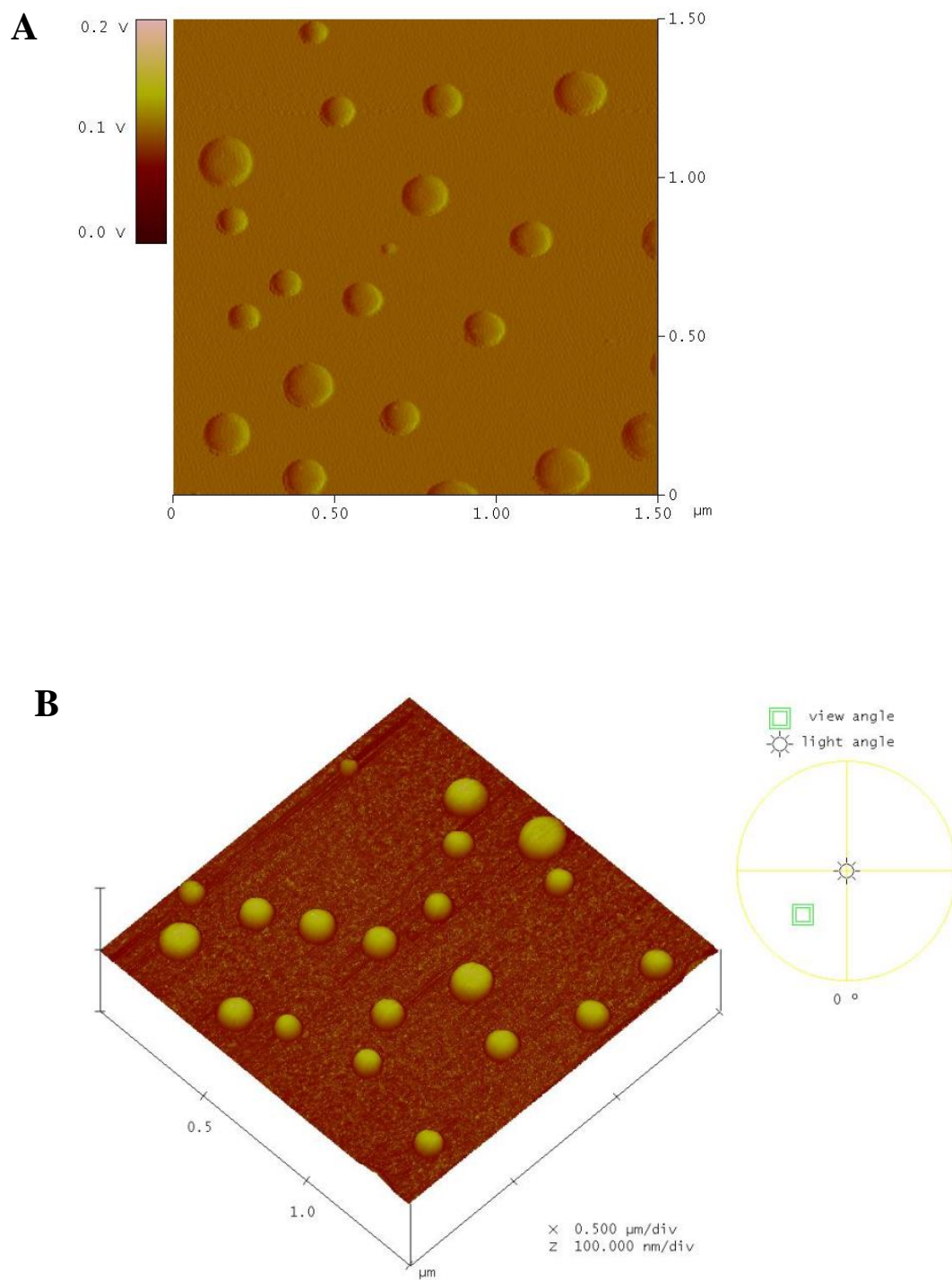


FIGURA 21 – Imagem dos lipossomas branco obtida por AFM. Em (A), imagem em altura (1,5 μm X 1,5 μm) e em (B), visão tridimensional das vesículas (1,5 μm X 1,5 μm).

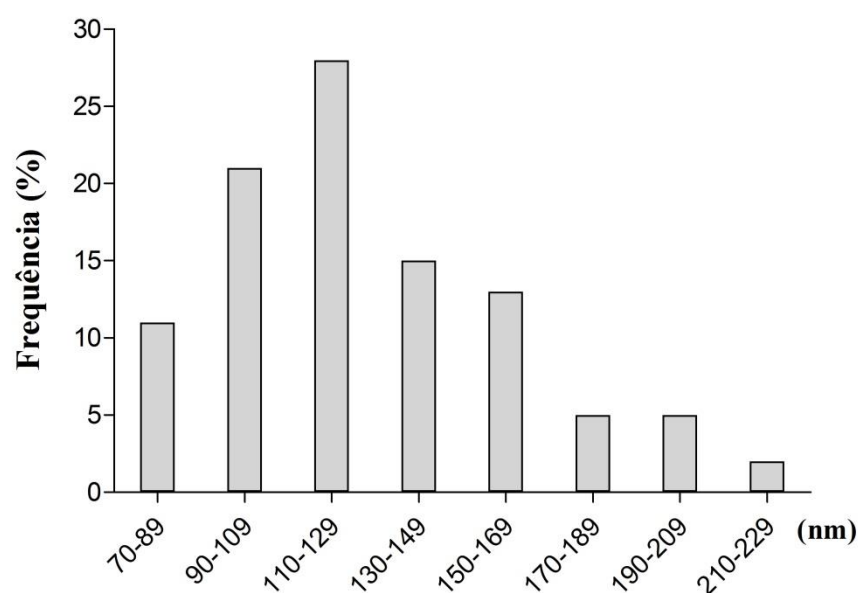


FIGURA 22 – Gráfico com a distribuição dos diâmetros das vesículas da formulação de lipossomas branco obtidos por AFM.

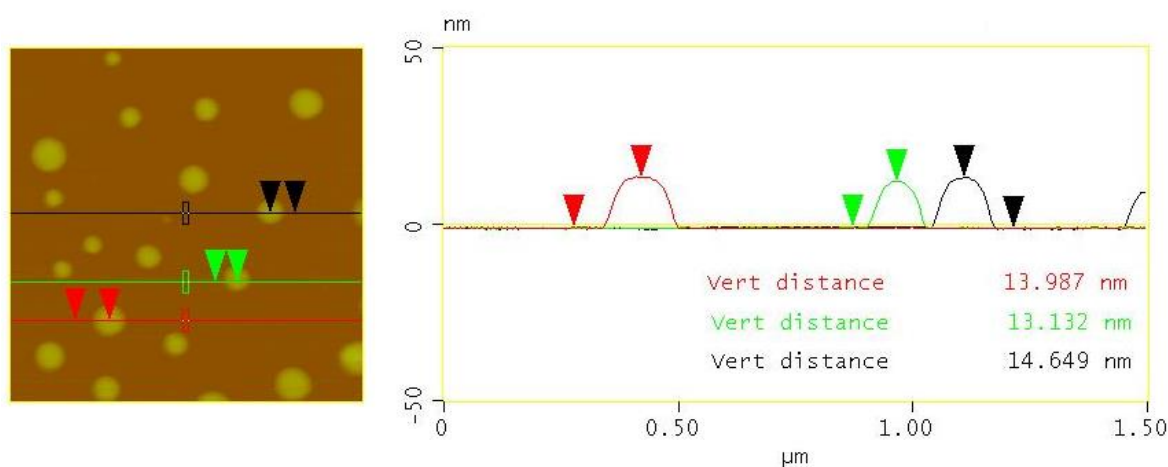


FIGURA 23 – Imagem de altura (A) e perfil topográfico (B) de lipossomas branco obtidos por AFM.

A análise dos lipossomas contendo PTX mostrou, novamente, estruturas com formato esférico regular. No entanto, é possível perceber uma maior heterogeneidade entre o diâmetro das vesículas, em comparação aos lipossomas brancos (Figura 24 A e B). A distribuição de tamanho das vesículas obtida para contagem de 100 partículas em 10 diferentes campos para os lipossomas contendo PTX é mostrada na figura 25. Foi observado um aumento no diâmetro médio das vesículas para $156,5 \pm 52,5$ nm e a altura variou entre 10,8 a 21,9 nm, apresentando média equivalente a $17,2 \pm 2,3$ nm.

A avaliação da relação diâmetro/altura foi de $9,2 \pm 3,1$, demonstrando, mais uma vez, a possibilidade de vesículas mais achatadas (Figura 26). O diâmetro médio e o índice de polidispersão dessa mesma amostra obtida por PCS foram $188,9 \pm 0,4$ nm e $0,35 \pm 0,05$, respectivamente.

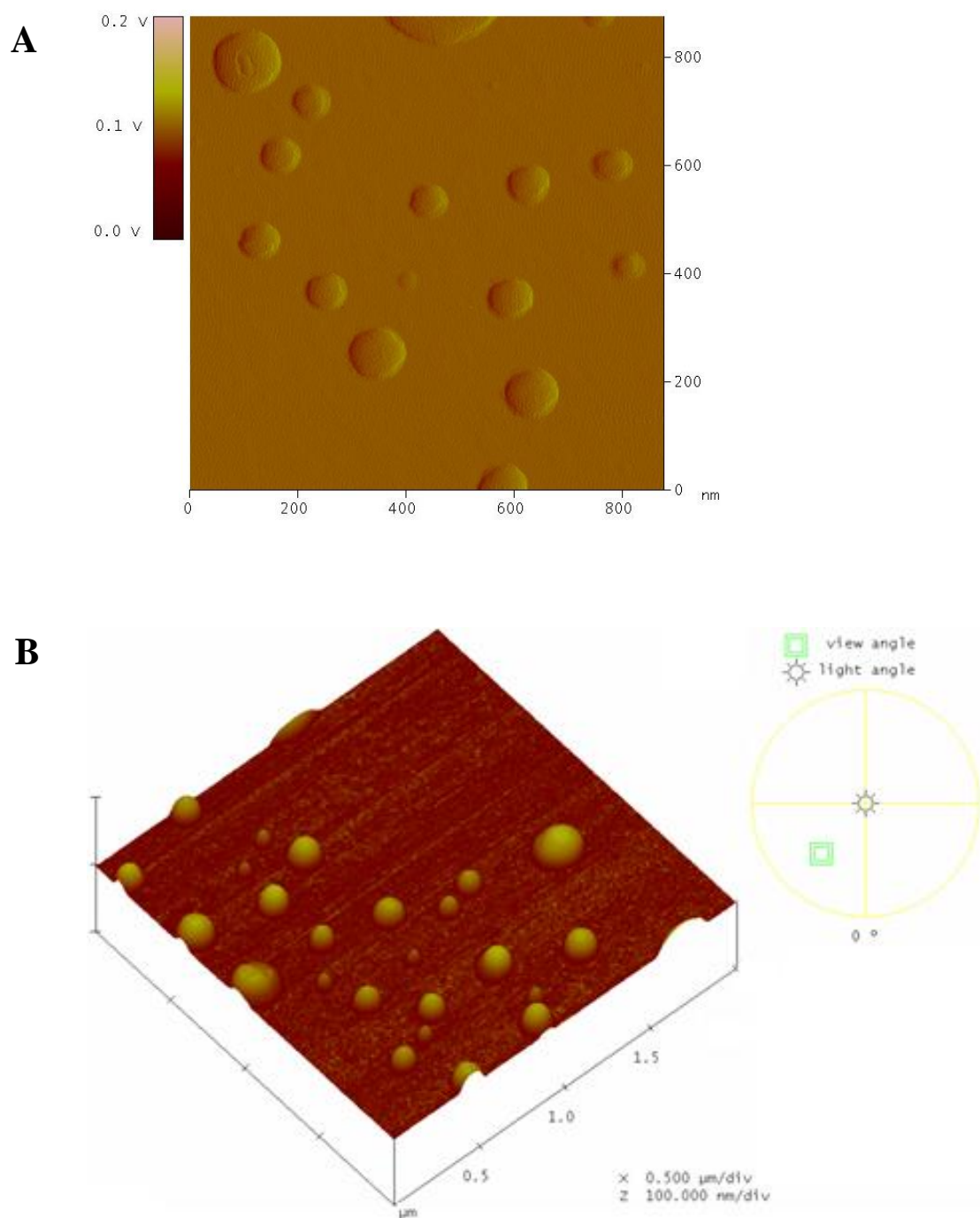


FIGURA 24 – Imagem dos lipossomas contendo PTX obtida por AFM. Em (A), imagem em amplitude (1,0 μm X 1,0 μm) e em (B), visão tridimensional das vesículas (1,5 μm X 1,5 μm).

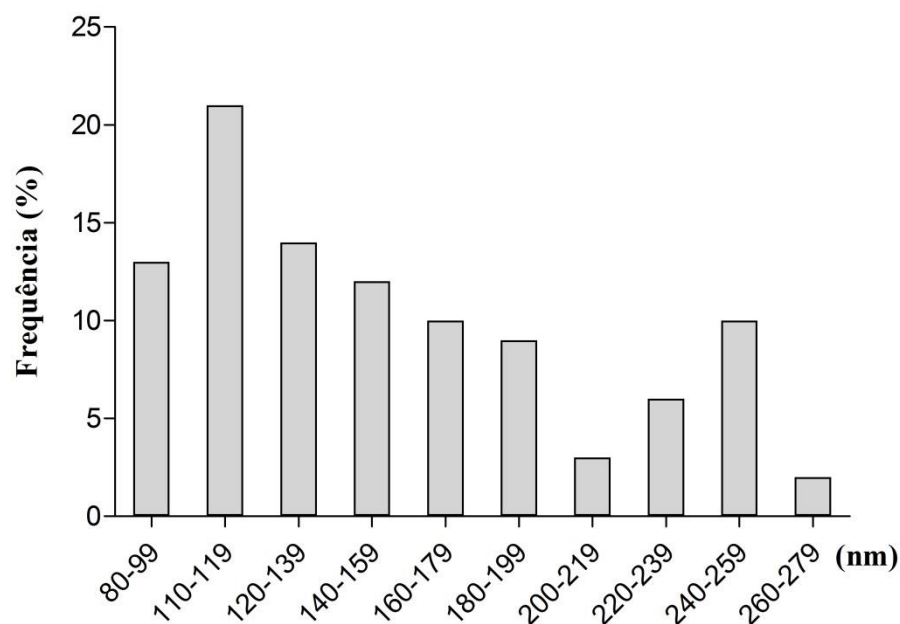


FIGURA 25 - Gráfico com a distribuição dos diâmetros das vesículas da formulação de lipossomas contendo PTX obtidos por AFM.

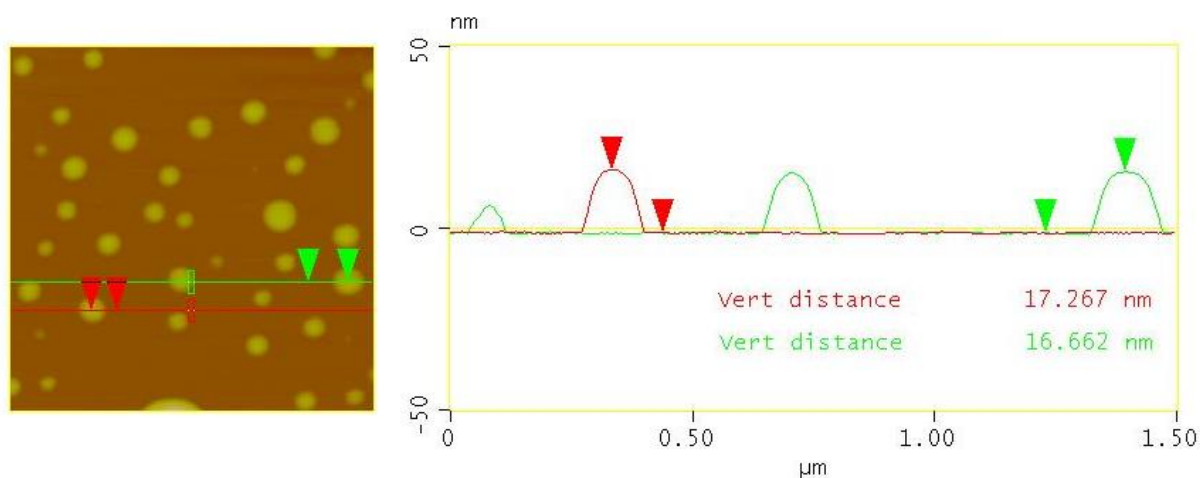


FIGURA 26 – Imagem de altura (A) e perfil topográfico (B) de lipossomas contendo PTX obtidos por AFM

Considerando que, para análise dos lipossomas por AFM, é necessário que as vesículas sejam adsorvidas sobre a mica sofrendo deformação em estruturas mais planares, o diâmetro obtido por AFM é uma aproximação do diâmetro das vesículas em solução, refletindo com certa fidelidade o tamanho real das vesículas lipossomais (KANNO et al., 2002). Entretanto, a análise de diâmetro médio por PSC não mostrou diferença daqueles obtidos por AFM. Apesar de obter resultados para o diâmetro médio das vesículas em

solução, a técnica de PCS mede o raio/diâmetro hidrodinâmico das partículas, considerando uma parte da dupla camada elétrica que as partículas assumem quando em solução (AKBARI et al., 2011).

Como já mencionado, a relação diâmetro/altura observada sugere a existência de vesículas achatadas, possivelmente, resultado do processo de deposição dos lipossomas sobre a superfície da mica, com a perda do conteúdo aquoso interno após a secagem da amostra e achatamento proporcionado pela força que a sonda exerce durante sua interação com a amostra. A análise morfológica por AFM de lipossomas compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG carreando o ácido dietileno gadolínio também mostrou uma relação diâmetro/altura próximo a 9 sugerindo a mesma hipótese de vesículas achatadas (SOARES et al., 2011). Há relatos que, aparentemente, uma única bicamada lipídica tem mostrado altura equivalente entre 6,0 a 7,5 nm (JASS et al., 2000; NAKANO et al., 2008). Nesse contexto, a altura média equivalente a 14,5 nm para os lipossomas sem associação ao PTX, sugere a possibilidade de empilhamento de duas bicamadas na superfície da mica, uma inferior e outra superior, como é demonstrado no esquema da Figura 27. Apesar da altura e do diâmetro das vesículas da formulação contendo PTX ser maiores que a LpHS possivelmente em função da presença da molécula volumosa do PTX na bicamada lipídica, pode-se dizer que a capacidade de achatamento e empilhamento não foi alterada pela presença do fármaco. A relação diâmetro/altura obtida para a formulação contendo PTX foi semelhante aquela obtida para LpHS. Além disso, a presença de vesículas com alturas variáveis sugere a existência de LUV e MLV, uma vez que o método de produção por Bangham, combinado com calibração por sonicação, proporciona a formação de vesículas uni e multilamelares (WOODBURY et al., 2006; LAPINSKI et al., 2007).

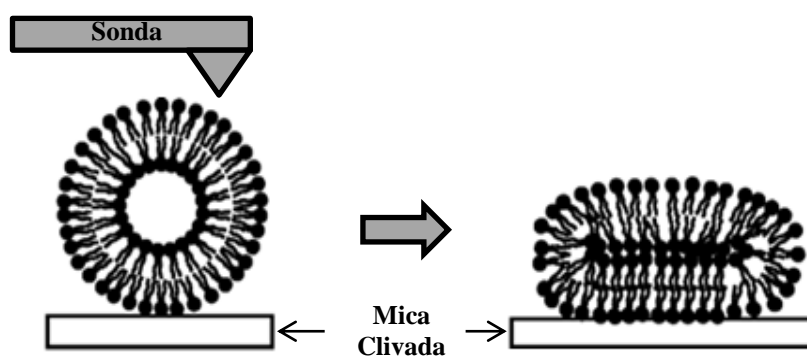


FIGURA 27 – Modelo esquemático de lipossomas adsorvidos na superfície da mica, antes e após o contato com a sonda (Adaptado de NAKANO et al., 2008).

3.5 Estudo de Estabilidade Preliminar

Para uma formulação lipossomal ser considerada efetiva como um sistema de vetorização de fármaco é extremamente importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável, desde sua produção até a administração (SHARMA; SHARMA, 1997). Durante a estocagem, as vesículas lipossomais podem sofrer tanto alterações físicas quanto químicas. As mudanças físicas incluem fusão e agregação das vesículas e extravasamento do fármaco encapsulado, enquanto as químicas incluem oxidação dos fosfolípides que contem cadeias de ácidos graxos insaturados e hidrólise das ligações ésteres dos fosfolípides que se encontram em dispersões aquosas. Todas essas alterações podem levar à perda do material encapsulado e das características necessárias à formulação destinadas a administração parenteral influenciando a performance *in vivo* da formulação (CHOW; HEATH, 1995; SHARMA; SHARMA, 1997; TORCHILIN, 2005). A maioria dos problemas de instabilidade é mais pronunciada em formulações lipossomais compostas por moléculas de baixo peso molecular e fármacos solúveis em água (GULATI et al., 1998).

Considerando essas questões, a formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato (5,7:3,8:0,45:0,05) a 10 mM e 0,5 mg/mL de PTX foi verificada quanto a estabilidade durante 150 dias de armazenamento em termos de teor de encapsulação, diâmetro médio, distribuição de tamanho das vesículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Os resultados para as características físico-químicas para as formulações DOPE:CHEMS:DSPE-PEG e DOPE:CHEMS:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato com concentração total lipídica igual a 10 mM são mostrados na tabela 13, e não foi observada diferença significativa para os parâmetros considerando as duas formulações.

TABELA 13– Diâmetro médio, índice de polidispersão, concentração de PTX encapsulada, teor de encapsulação e potencial zeta das formulações lipossomais compostas por DOPE:CHEMS:DSPE- PEG e DOPE:CHEMS:DSPE-PEG-folato na concentração lipídica total de 10 mM e 0,5 mg/mL de PTX*.

Concentração inicial de PTX (mg/mL)	Diâmetro Médio \pm DP (nm)	Índice de Polidispersão \pm DP	Concentração de PTX encapsulada \pm DP (mg/mL)	Teor de Encapsulação \pm DP (%)	Potencial Zeta (ζ) \pm DP (mV)
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG					
0,5	188,9 \pm 9,4	0,35 \pm 0,05	0,45 \pm 0,02	96,8 \pm 1,5	+2,7 \pm 2,2
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato					
0,5	186,0 \pm 12,7	0,33 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	92,9 \pm 4,7	+3,0 \pm 1,1

*Valores expressos com média \pm desvio padrão (n = 3)

Conforme mostrado na figura 28, a incorporação do PTX na bicamada lipídica foi bastante estável durante o período de armazenamento, sofrendo um decaimento de 15% ($p < 0,05$) no 150º dia. A boa estabilidade em termos de retenção do PTX pode ser explicada em função do caráter lipofílico da molécula ($\log P = 6,9$) (NEJATPOUR et al., 2011) que permite uma maior interação com os fosfolípidos da bicamada lipídica, e, por sua vez, tende a retardar a liberação do fármaco durante o armazenamento. Além disso, durante o período de armazenamento o pH da formulação manteve-se estável, em torno de 7,1, possivelmente contribuindo para o aprisionamento do fármaco nas bicamadas das vesículas, um vez que, a fase lamelar dos lipossomas é mantida nessa faixa de pH, como foi mostrado pelos dados de SAXS e avaliação da pH-sensibilidade.

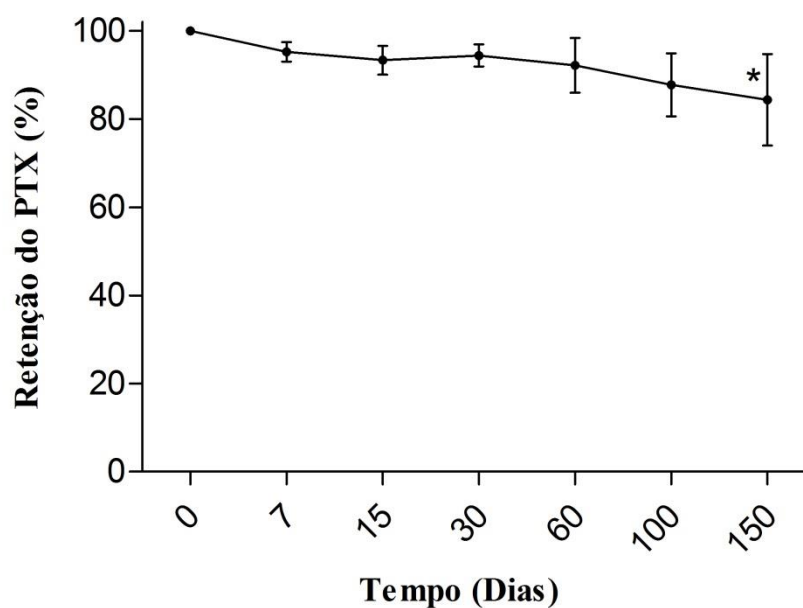


FIGURA 28 – Perfil de retenção do PTX observado durante o período de armazenamento de 150 dias. (*) Representam diferença significativa em relação ao dia 0 (n = 3).

O potencial zeta das formulações também não sofreu alterações ($p > 0,05$), se mostrando estável durante o armazenamento e próximo da neutralidade (Figura 29). Como já relatado, esse valor de carga próximo à neutralidade se deve à presença do DSPE-PEG₂₀₀₀ que contribui para estabilização das cargas das vesículas, mesmo em presença do CHEMS que confere uma carga negativa à superfície dos lipossomas. Valores de mobilidade eletroforética baixo e, automaticamente, potencial zeta próximo à neutralidade são verificados a partir da utilização do DSPE-PEG na concentração de 5% (WOODLE et al., 1995), estando coerente com os resultados obtidos.

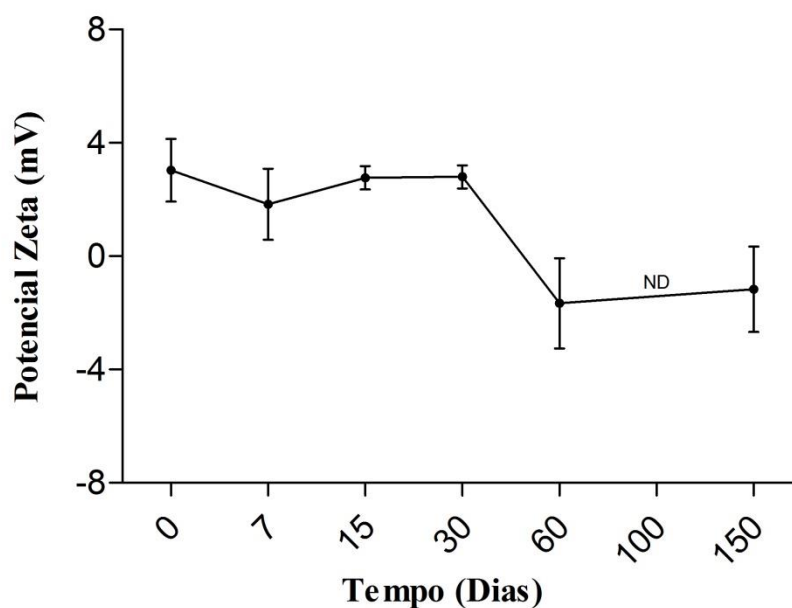


FIGURA 29 – Variação do potencial zeta durante o armazenamento por 150 dias. ND = zeta não determinado para o dia 100 (n = 3).

A figura 30 mostra os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão avaliados ao longo de 150 dias. Em relação ao diâmetro médio das vesículas nenhuma alteração foi observada durante 100 dias de avaliação. No entanto, um aumento no diâmetro médio em cerca de 20%, significativamente diferente do dia inicial do estudo, foi verificado para o 150º dia ($p < 0,05$). O índice de polidispersão também manteve inalterado até o 100º dia e no 150º dia foi possível verificar aumento significativo ($p < 0,05$), variando de 0,32 para 0,55. No que diz respeito à distribuição de tamanho, cerca de 83% das vesículas apresentaram diâmetro menor que 300 nm no 150º dia, mostrando uma diminuição inferior a 4% em relação ao dia zero (86,4%). Vale ressaltar ainda que, menos de 5% das vesículas exibiram diâmetro maior que 500 nm no último dia de análise, sendo o maior diâmetro verificado em torno de 850 nm (0,2%).

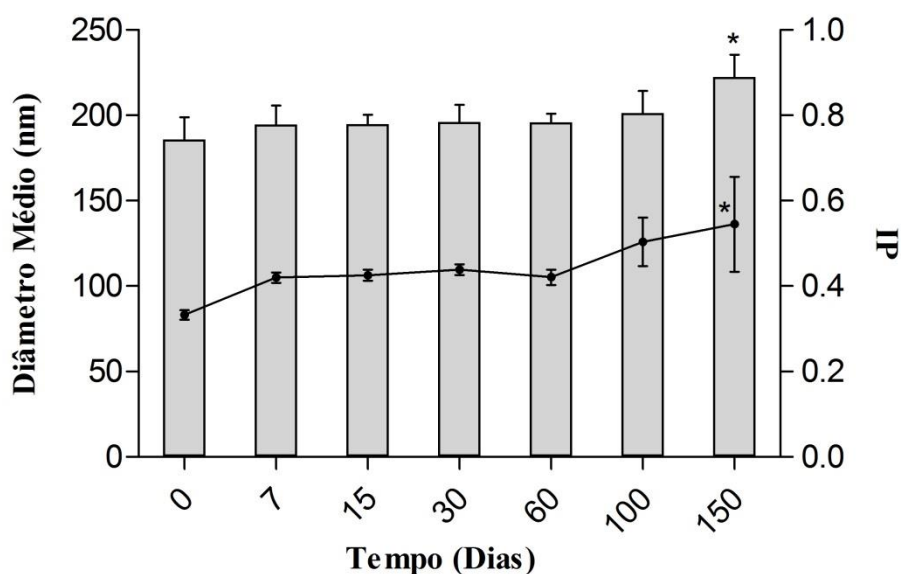


FIGURA 30 – Diâmetro médio (barra) e índice de polidispersão (ponto) avaliado durante o período de armazenamento de 150 dias. (*) Representam diferença significativa para o diâmetro médio e o índice de polidispersão em relação ao dia 0 (n = 3).

Os resultados evidenciam uma boa estabilidade para a formulação em termos de diâmetro médio e índice de polidispersão das vesículas durante 100 dias de armazenamento, que podem ser explicados devido à presença do PEG nas formulações lipossomais. Segundo Blume e Cevc (1990) as cadeias do PEG são flexíveis e com mobilidade suficiente a ponto de apresentarem uma densa “nuvem conformacional” que resulta no surgimento de forças estéricas e dinâmicas entre o interior de suas cabeças polares e se estendem até a região interfacial, entre o interior da membrana hidrofóbica e a solução circundante. Logo, como já descrito, essa “nuvem conformacional” proporciona um efeito estérico para as vesículas impedindo suas aproximações e assim desfavorecendo os fenômenos físicos de agregação e fusão, os quais, quando acontecem, contribuem para o aumento no diâmetro das vesículas lipossomais durante a estocagem (ISHIDA et al., 2002; KIM et al., 2009). Além disso, Perkins e colaboradores (2000) durante uma investigação acerca da estabilidade de partículas contendo lípides peguilados com diferentes cadeias lipídicas associadas ao PEG e PEG₅₀₀₀, concluíram que as vesículas mais estáveis eram compostas pelo DSPE-PEG. Dessa forma, possivelmente, esse efeito protetor das cadeias do PEG, pode ter contribuído para a estabilidade física das vesículas lipossomais desse estudo.

Como considerado anteriormente, apesar do aumento do diâmetro médio e índice de polidispersão para o 150º dia de armazenamento, grande parte das partículas ainda permaneceram com diâmetro menor que 300 nm. Esse aumento pode ser justificado por eventual agregação ou fusão das partículas que levaram a formação de pequenos agregados de vesículas com diâmetro maior que 300 nm.

A estabilidade de formulações lipossomais contendo PTX descrita na literatura tem sido variada. Há relatos de formulações que se mantiveram estáveis, em armazenamento a 4°C, por cerca de dois meses e outras que mantiveram suas características físico-químicas por menos de 24 horas de armazenamento (SHARMA et al., 1994; CROSASSO et al., 2000; IMMORDINO et al., 2003; YANG et al., 2007a; YANG et al., 2007b; KOUDELKA; TURÁNEK, 2012). Dessa forma, pelos resultados explanados um ganho significativo em termos de estabilidade foi obtido com a formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato.

3.6 Estudos de Citotoxicidade *in vitro*

A quimioterapia é uma das modalidades terapêuticas mais requeridas para o tratamento do câncer. Entretanto, grande parte dos agentes quimioterápicos age de forma indiscriminada atingindo as células tumorais e saudáveis, principalmente as de crescimento rápido. Nesse contexto, sistemas para entrega de fármacos mediado por ligantes específicos desempenham um papel essencial na tentativa de contornar essa situação (KIM et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010; DA SILVA et al., 2012).

Os receptores para folato são frequentemente superexpressos em vários tipos de tumores malignos como endométrio, ovário, mama e cérebro, e ausente ou pouco expresso em células normais, tornando um atrativo para a entrega sítio-específico de fármacos (GABIZON et al., 2004; PARKER et al., 2005; KIM et al., 2008). Dessa forma, para investigar se a citotoxicidade do PTX seria afetada pela sua encapsulação em formulações lipossomais pH-sensíveis de circulação prolongada recobertas ou não por folato, foi utilizado o ensaio de metabolização do MTT para avaliar a viabilidade celular. O ensaio é baseado na conversão do MTT a cristais de formazan pela redutase mitocondrial presente na mitocôndria das células viáveis. Dessa forma, a viabilidade de células normais (L929) e neoplásicas (MCF-7 e MDA-MB-231) foi investigada após incubação, por 48 horas, com solução de PTX livre (PTX

livre), com PTX encapsulado em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada recobertos com folato (LpHSF-PTX) e lipossomas sem a presença desse ligante (LpHS-PTX). Para verificar a citotoxicidade da matriz da formulação, as células foram tratadas com as formulações brancas (LpHSF e LpHS).

Os dados obtidos para as linhagens normal (L929) e tumoral (MCF-7 e MDA-MB-231), expressos como porcentagem da viabilidade celular, são mostrados nas figuras 31 e 32, respectivamente. Os valores de IC_{50} para todas as linhagens são apresentados nas tabelas 14.

É possível perceber que, para todas as linhagens celulares, as formulações brancas testadas (LpSH e LpHSF) não mostraram atividade citotóxica expressiva. Esses dados indicam que estas formulações apresentam citotoxicidade desprezível quando comparadas com as formulações contendo o fármaco. Vale ressaltar também que a viabilidade celular testada para o solvente do PTX livre (etanol desidratado: CrEL) foi de aproximadamente 100% para todas as linhagens estudadas.

Considerando a linhagem de células normais (L929), aumento da atividade citotóxica ($p < 0,001$) foi observado para a formulação do PTX livre nas duas concentrações mais altas testadas (100 e 500 nM), comparada com as demais formulações. Lin e colaboradores (2012) ao desenvolverem um hidrogel termossensível para liberação sustentada do PTX, em conjugação com poli(ϵ -caprolactona)-polietilenoglicol-poli(ϵ -caprolactona), avaliaram sua citotoxicidade pelo método do MTT nas linhagens celulares tumorais MFC-7 e HepG-2 (linhagem de tumor de fígado) e na linhagem de célula normal L929. Como resultados, verificaram que as células normais exibiram uma citotoxicidade reduzida em comparação às linhagens tumorais, tanto para o PTX livre quanto para a formulação contendo o fármaco. Nessa oportunidade eles atribuíram essa resposta às células normais (L929), possivelmente, em função da extensão reduzida de captação celular para o PTX.

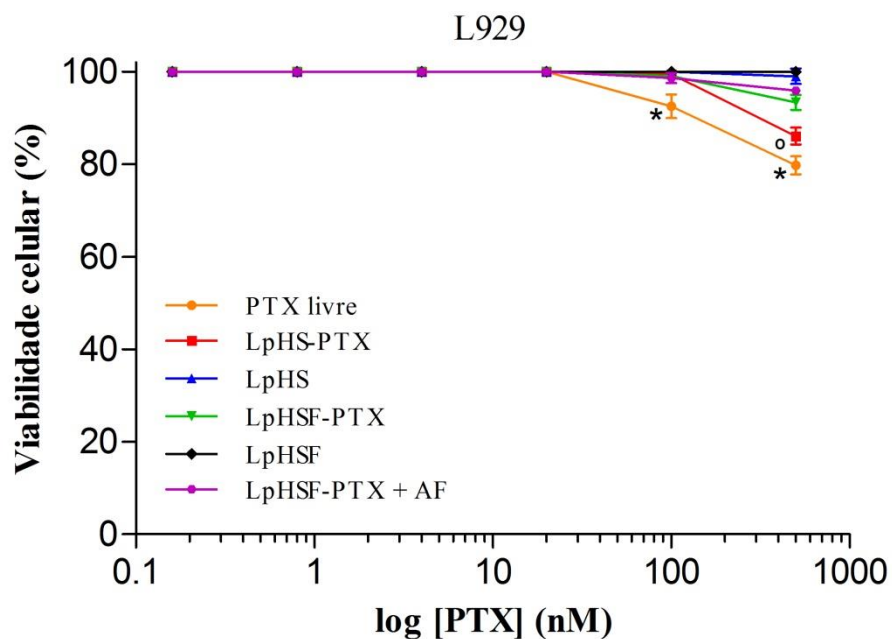


FIGURA 31 – Viabilidade celular mediada pelo ensaio do MTT para PTX livre, LpHS-PTX, LpHS, LpHSF-PTX, LpHSF e LpHSF-PTX + AF em células da linhagem L929 após 48 horas de tratamento. (*) Representa diferença significativa em relação ao LpHS-PTX, LpHSF-PTX e LpHSF-PTX + AF ($p < 0,001$). (°) Representam diferença significativa em relação ao LpHSF-PTX e LpHSF-PTX + AF ($p < 0,001$). Dados expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as contendo PTX.

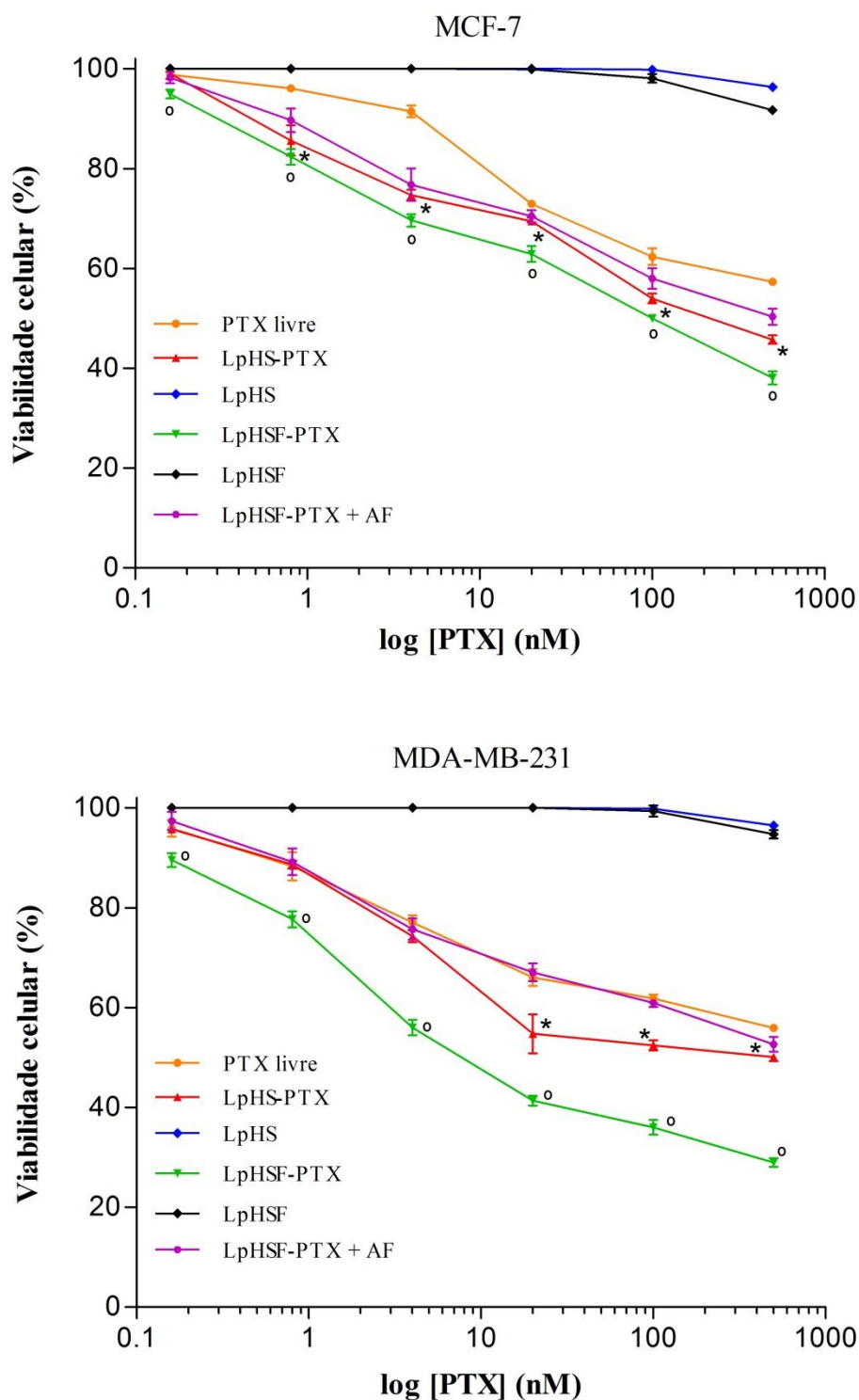


FIGURA 32 – Viabilidade celular mediada pelo ensaio do MTT para PTX Livre, LpHS-PTX, LpHS, LpHSF-PTX, LpHSF e LpHSF-PTX + AF em células das linhagens tumorais MFC-7 e MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. (*) Representa diferença significativa em relação ao PTX livre ($p < 0,01$) e (°) Representam diferença significativa em relação ao PTX livre ($p < 0,01$), LpHS-PTX e LpHSF-PTX + AF ($p < 0,05$). Dados expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as contendo PTX.

TABELA 14 – Valores de IC₅₀ calculados para as linhagens de células tumorais e normais*.

Linhagem Celular	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (nM)
	PTX livre	LpHS-PTX	LpHSF-PTX	LpHSF-PTX + AF (1mM)
MCF-7	660,7 ± 42,5	214,1 ± 16,7	97,6 ± 9,5	357,8 ± 59,0
MDA-MB-231	689,3 ± 32,8	183,1 ± 36,6	15,7 ± 1,4	449,9 ± 11,2
L929	2573,3 ± 576,6	1257,5 ± 81,0	4177 ± 1038,2	-

*Valores expressos com média ± desvio padrão (n = 3).

Para os tratamentos associados ao PTX, considerando as linhagens celulares tumorais, uma redução da viabilidade celular foi observada a medida que a concentração de PTX foi aumentada. Para as linhagens celulares tumorais, a atividade citotóxica observada após o tratamento com PTX livre foi bastante semelhante. A IC₅₀ determinada foi igual a 660,7 ± 42,5 e 689,3 ± 32,8 nM para MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente. Resultados obtidos para o PTX livre corroboram outros previamente descritos (YANG et al., 2007a; TRICKLER et al., 2008; JAIN et al., 2012; GU et al., 2012). Considerando o tratamento com a formulação de LpHS-PTX foi possível verificar para a linhagem MFC-7 que em todas as concentrações testadas, exceto a menor, a viabilidade metabólica celular foi significativamente reduzida em comparação com PTX livre (p<0,01). Por outro lado, para as células MDA-MB-321 essa diferença somente foi verificada para as concentrações de 20, 100 e 500 nM (p<0,01). O valor das IC₅₀ para as células MCF-7 e MBA-MB-231 foram 214,1 ± 6,7 e 183,1 ± 36,6 nM, respectivamente, demonstrando maior efetividade citotóxica da formulação LpHS-PTX em comparação ao PTX livre.

Esse aumento na citotoxicidade observado após tratamento com LpHS-PTX sugere maior captação das vesículas lipossomais que o PTX na sua forma livre. De fato, no estudo conduzido por Gu e colaboradores (2012) para investigar a captação de nanocarreadores para o PTX através da quantificação por CLAE, observou-se que uma maior quantidade de PTX associado aos nanocarreadores foi captada pelas células MCF-7 do que para o PTX livre (dissolvido em etanol). Além disso, tem sido sugerido que os lipossomas pH-sensíveis são captados e internalizados de uma maneira mais eficiente se comparada ao fármaco livre (FATTAL et al., 2004). Portanto, é sugestivo que, os LpSH-PTX favorecem a captação celular do fármaco, estando as células mais susceptíveis à ação do PTX.

Em relação ao tratamento via direcionamento por receptores de folato, pôde-se observar que a atividade citotóxica dos LpHSF-PTX foi significativamente maior do que a observada tanto para o PTX livre quanto para a formulação não funcionalizada com PTX (LpSH-PTX), considerando as duas linhagens tumorais. Esses resultados podem ser explicados pela presença do receptor para folato na membrana das células MFC-7 e MDA-MB-231 (MEIER et al., 2010), que contribui para maior captação dos lipossomas em função da ligação do ácido fólico associado ao DSPE-PEG. Ao ser reconhecido, o ácido fólico se liga a esses receptores com alta afinidade e depois são internalizados aos endossomas (SUDIMACK; LEE, 2000; LU; LOW, 2002). Tardamente, o pH no interior dessas vesículas atinge valores próximos de 5,0 que irão favorecer a desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis liberando o PTX, o qual ficará disponível para desencadear sua ação biológica.

Vários estudos vêm relatando o crescente interesse no delineamento de sistemas para vetorização de fármacos com ligantes para os receptores de folato. Steves e Lee (2003) mostraram que uma emulsão carreando PTX e funcionalizada com folato foi muito mais citotóxica para células tumorais KB, que superexpressam receptores para folato, que a emulsão não funcionalizada. Nesse mesmo contexto Wu e colaboradores (2006) mostraram que lipossomas compostos por DPPC:DMPG:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato (8,5:0,95:0,45:0,05) carreando o PTX foram 3,8 vezes mais citotóxicos que os lipossomas que não continham folato, para células KB. Todas essas evidências mostraram que o direcionamento via receptor de folato aumenta a captação das vesículas lipossomais pelas células que apresentam esses receptores, possibilitando assim maior liberação do PTX e atividade citotóxica.

Há indícios que, em se tratando de conjugados direcionados a captação via receptor de folato, o número total de conjugados internalizados é proporcional à quantidade de expressão desses receptores pela célula. Em média, as células internalizam os conjugados a uma taxa de aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^5$ moléculas/célula/hora (LU; LOW et al., 2002). Dessa forma, possivelmente, percebe-se uma maior expressão de receptor para folato nas células MDA-MB-231, uma vez que, a IC_{50} para essa célula foi, aproximadamente, 6 vezes menor que a apresentada por MCF-7, indicando maior atividade citotóxica. De fato, essa diferença é qualitativamente sugerida por Jhaveri e colaboradores (2004) através uma análise em *Western blot* dos níveis dos receptores de folato em um painel com oito tipos de linhagens celulares de tumor de mama (MCF-7, ZR-75-1, SK-BR-3, MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T47D e MDA-MB-468), duas linhagens de células mamárias normais e imortalizadas (MCF-10 e HS578T-BST) e uma linhagem celular primária normal de célula

mamária (HMEC). Adicionalmente, Garin-Chesa e colaboradores (1993), durante um ensaio imuno-histoquímico para verificar a expressão dos receptores de folato em uma série de linhagens de carcinoma humano, conseguiram detectar a expressão desse receptor em MDA-MB-231 e, apesar de não apresentarem reatividade para a MCF-7, eles ressaltam que essas expressam os receptores para folato em quantidade menor.

Para demonstrar que a presença do folato nas preparações tem um papel importante na captação das vesículas pelas células tumorais, essas foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento pela adição de AF a 1mM por um período de 1 hora antes do tratamento com a formulação de LpSHF-PTX. Os resultados mostraram, para as duas linhagens, aumento na viabilidade celular para todas as concentrações frente ao pré-tratamento com AF, sugerindo, desse modo, que o AF livre é capaz de saturar os receptores da superfície das células, diminuindo a captação lipossomal e, conseqüentemente a atividade citotóxica do PTX associado a essa formulação. Saul e colaboradores (2003) também verificaram essa relação de saturação dos receptores celulares através da inclusão prévia de AF livre durante a captação da doxorrubicina associada a lipossomas funcionalizados com folato. Nesse contexto, eles mostraram que o pré-tratamento com AF livre diminuiu a captação dos lipossomas pelas células KB e HeLa (câncer cervical), o que não foi observado para células C6 (glioma), isso porque, as primeiras superexpressavam receptores para folato, o que não era observado para as células C6. Nos lipossomas desenvolvidos por Wu e colaboradores (2006) essa diminuição na captação lipossomal também foi verificada, e os valores de IC_{50} para as células KB passaram de 0,048 μ M para 0,151 μ M, mostrando a dependência do receptor livre para captação dos lipossomas funcionalizados.

Por fim, um importante critério a ser estabelecido para possíveis aplicações clínicas de uma formulação é determinar a possível ausência de efeitos tóxicos sobre as células normais do hospedeiro, comparado à atividade contra as células doentes. Essa análise pode ser obtida pelo cálculo do índice de seletividade, que indica a seletividade de um composto ou formulação entre uma linhagem neoplásica e uma normal (NAKAMURA et al., 2006). Os valores de IS para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 são mostrados na tabela 15.

TABELA 15 – Índice de seletividade calculado para as linhagens de células tumorais*.

Índice de Seletividade	PTX livre	LpHS-PTX	LpHSF-PTX
MCF-7	3,9	5,9	42,8
MDA-MB-231	3,7	6,9	265,2

*Valores expressos com média \pm desvio padrão (n = 3).

A formulação LpHS-PTX demonstrou ser, em média, cerca de 6,5 vezes mais ativa contra as células tumorais do que células normais. Entretanto, quando associada ao folato (LpHSF-PTX), o índice de seletividade para MFC-7 e MDA-MB-231 aumenta cerca de 7,2 e 38,4 vezes, respectivamente, indicando toxicidade muito baixa para células normais (L929) e efetividade contra as células tumorais. Essas observações reforçam a maior atividade citotóxica para a formulação LpHSF-PTX e a diferença de expressão de receptores para folato entre as linhagens como discutido anteriormente e verificado por estudo prévio (GARIN-CHESA et al., 1993). Dessa forma, o uso da formulação de LpHSF-PTX pode ser uma estratégia promissora para transportar o PTX e permitir sua administração intravenosa na terapia tumoral.

4 CONCLUSÕES

No presente estudo foram desenvolvidas e caracterizadas formulações lipossomais com diferentes concentrações de PTX e com diferentes composições quali e quantitativas de lípides. Durante o delineamento farmacotécnico, preparações com tamanho adequado para administração intravenosa foram obtidas com as diferentes composições estudadas. No entanto, considerando que o objetivo do presente estudo foca no desenvolvimento de um sistema multifuncionalizado mediante pH-sensibilidade e ligação de receptores de folato, a partir das análises de SAXS e pH-sensibilidade, constatou-se que a inclusão da SPC na bicamada promoveu alteração na propriedade da pH sensibilidade da formulação. Por outro lado, os espectros de SAXS para a formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG mostraram que as vesículas lipossomais mantinham a fase lamelar em pH 7,4 enquanto a redução do pH para 5,0 resultou em transição para fases não lamelares. Esses achados foram confirmados pelo estudo de pH sensibilidade, no qual a redução do pH resultou em desestabilização das vesículas com consequente liberação do PTX. Com base nesses dados e nos resultados obtidos no estudo de desenvolvimento, a formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na concentração lipídica total de 10 mM e 0,5 mg/mL de PTX foi considerada a mais adequada pois apresentou cerca de 97% de teor de encapsulação, diâmetro médio e índice de polidispersão de 188,9 nm e 0,35, respectivamente. Além disso, mais de 90% da população de vesículas apresentaram tamanho inferior a 300 nm. Diante dessas características promissoras, essa formulação foi selecionada para os estudos de estabilidade de armazenamento e citotoxicidade *in vitro*.

Por meio da análise morfológica por AFM, foi observado que as vesículas lipossomais apresentavam formato esférico regular sem indicativos de agregação das mesmas. Os resultados para diâmetro médio e a distribuição de tamanho das vesículas mostraram semelhança com os resultados obtidos por PCS, mostrando diâmetro médio inferior a 200 nm e uma distribuição heterogênea das vesículas. Além disso, foi possível indicar pela altura que os lipossomas sofriam um achatamento durante a adsorção na mica e contato com a sonda de análise.

A formulação LpHSF-PTX (10 mM e 0,5 mg/mL) apresentou teor de encapsulação de aproximadamente 93%, potencial zeta igual a +3,0 mV, diâmetro médio e índice de polidispersão equivalentes a 186,0 nm e 0,33, respectivamente. Essa formulação mostrou ser estável nos 100 primeiros dias, mostrando ligeiro aumento no diâmetro médio e índice de

polidispersão a partir do centésimo dia. No 150º dia de análise, uma diminuição na retenção do PTX, aproximadamente, 14% de liberação foi observada.

O ensaio de citotoxicidade mostrou que a encapsulação do PTX em LpHS ou LpHSF não prejudicou o seu efeito citotóxico. No entanto, a formulação LpHSF-PTX mostrou maior atividade citotóxica quando comparada com os demais grupos testados, evidenciando que a associação com folato promoveu o aumento da captação das vesículas pelas células tumorais. A atividade citotóxica foi menor para a linhagem tumoral MCF-7, uma vez que essa expressa menor quantidade de receptores para folato que a linhagem MDA-MB-231. Além disso, essa formulação mostrou ser altamente seletiva para as linhagens tumorais (IS iguais a 265 e 42,8 para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente).

Dessa forma, ganhos importantes em termos de estabilidade e citotoxicidade foram obtidos no presente estudo. Essa nova formulação multifuncionalizada representa uma alternativa interessante e promissora para administração intravenosa do PTX no tratamento do câncer, com possibilidade de maior eficácia quando comparada ao tratamento convencional com Taxol®.

5 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se propor algumas perspectivas, a saber:

- Realizar estudos complementares na tentativa de esclarecer os mecanismos de citotoxicidade dos LpHSF-PTX.
- Avaliar a organização supramolecular da formulação SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG.
- Avaliar a atividade antitumoral em modelo experimental de tumor de mama.
- Avaliar a toxicidade *in vivo*.
- Avaliar a biodistribuição e o perfil farmacocinético dos LpHSF-PTX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, B.; TAVANDASHTI, P.; ZANDRAHIMI, M. Particle size characterization of nanoparticle – a practical approach. *Iranian Journal of Materials Science & Engineering*, v. 8, p. 48-56, 2011.

AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHKI, K. Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters*, v. 8, p. 102-111, 2013.

ALLEN, T. M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Letters*, v. 223, p. 42-46, 1987

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANNARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. *Química Nova*, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos. Resolução n. 899, de 20 de maio de 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 17 de maio de 2013.

ANTUNES, M. S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas em soluções nutritivas parenterais. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 85, p. 121-127, 2004.

AVANTI – AVANTI[®] POLAR LIPIDS, INC. 2012. Disponível em <<http://avantilipids.com/>>. Acesso em 15 de janeiro de 2014.

BADEA, I.; CIUTARU, D.; LAZAR, L.; NICOLESCU, D.; TUDOSE, A. Rapid HPLC method for the determination of paclitaxel in pharmaceutical forms without separation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, p. 501-507, 2004.

BALAMURALIDHARA, V.; PRAMODKUMAR, T. M.; SRUJANA, N.; VENKATESH, M. P.; GUPTA, V. N. V.; KRISHNA, K. L.; GANGADHARAPPA, H. V. pH sensitive drug delivery systems: A review. *American Journal of Drug Discovery and Development*, v. 1, p. 24-48, 2011.

BALAZS, D. A.; GODBEY, W. T. Liposomes for use in gene delivery. *Journal of Drug Delivery*, p. 1-12, 2011.

BANGHAN, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion on univalent ions the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M.; MAGALHÃES N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estudo da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 167-179, 2007.

BEIJA, M.; SALVAYRE, R.; VIGUERIE, N. L-DE.; MARTY, J-D. Colloidal systems for drug delivery from design to therapy. *Trends in Biotechnology*, v. 30, p. 485-496, 2012.

BERGER, N.; SACHSE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 223, p. 55-68, 2001.

BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanotechnology: the impact passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 66, p. 2-25, 2014.

BLUME, G.; CEVC, G. Liposomes for the sustained drug release *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1029, p. 91-97, 1990.

BRAGA, R. R.; SALES, J.; MARINS, R. C. E. E.; ORTIZ, G. M. D.; GARCIA, S. Development and validation of a method for allantoin determination in liposomes and pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 91, p. 389-394, 2012.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro-Filho, G. *Bogliolo Patologia*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 219-276.

BURM, J. P. Stability and compatibility of taxol with various drugs during simulated y-site administration. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 31-41, 2005.

CASALS, E.; GALÁN, A. M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *Chemistry and Physics Lipids*, v. 125, p. 139-146, 2003.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science AAAS*, v. 331, p. 1559-1564, 2011.

CHARROIS, G. J. R.; ALLEN, T. M. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1663, p. 167-177, 2004.

CHARROIS, G. J. R.; ALLEN, T. M. Rate of biodistribution of STEALTH[®] liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1609, p. 102-108, 2003.

CHEN, D.; JIANG, X.; HUANG, Y.; ZHANG, C.; PING, Q. pH-sensitive mPEG-Hz-cholesterol conjugates as liposome delivery system. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 25, p. 527-542, 2010.

CHOW, C.; HEATH, T. D. Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1239, p. 168-176, 1995.

CHUA, T. C.; YAO, P.; AKTHER, J.; MORRIS, D. L. Impact of tumor angiogenesis in peritoneal mesothelioma after radical cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Pathology and Oncology Research*, v. 16, p. 217-222, 2010.

CIUTARU, D.; BADEA, I.; LAZAR, L.; NICOLESCU, D.; TUDOSE, A. A HPLC validated assay of paclitaxel's related impurities in pharmaceutical forms containing Cremophor[®] EL. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 34, p. 493-499, 2004.

CONEY, L. R.; TOMASSETTI, A.; CARAYANNOPOULOS, L.; FRASCA, V.; KAMEN, A.; COLNAGHI, M. I.; JR-ZURAWSKI, V. R. Cloning of a tumor-associated antigen: Mov18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Research*, v. 51, p. 6125-6132, 1991.

CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, v. 18, p. 460-467, 1995.

CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release*, v. 63, p. 19-30, 2000.

DA SILVA, L. L.; DONNICI, C. L.; LOPES, J. C. D.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C.; DE PAULA, F. S.; BRAVO, C. E. S.; SANTORO, M. M.; DENADAI, A. M. L.; SANTOS, A. M. C.; MONTANARI, C. A. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. *Química Nova*, v. 35, p. 1318-1324, 2012.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 148, p. 135-146, 2010.

DASTIDAR, D. G.; SA, B. A comparative study of UV-spectrophotometry and first-order derivative UV-spectrophotometry methods for the estimation of diazepam in presence of tween-20 and propylene glycol. *AAPPS PharmaSciTech*, v. 10, p. 1396-1400, 2009.

DE BARROS, A. L. B.; MOTA, L. G.; SOARES, D. C. F.; SOUZA, C. M.; CASSALI, G. D.; OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, V. N. Long-circulating, pH-sensitive liposomes versus longa-circulating, non-pH-sensitive liposomes as a delivery system for tumor identification. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, p. 1-8, 2013.

DONATO, E. M.; CANEDO, N. A. P.; ADAMS, A. I. H.; FRÖHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição para o desenvolvimento de métodos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, p. 125-130, 2010.

DONG, Y-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 417, p. 101-111, 2011.

DONYAI, P.; SEWELL, G. J. Physical and chemical stability of paclitaxel infusions in different container types. *Journal of Oncology Pharmacy*, v. 12, p. 211-222, 2006.

EL-SAYED, A-A.; EL-SAYED, N, A. Recent developments od derivative spectrophotometry and their analytical applications. *Analytical Sciences*, v. 21, p. 595-614, 2005.

FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. “Smart” delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 931-946, 2004.

FENG, L.; MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. *Cancer Letters*, v. 334, p. 157-175, 2013.

FENG, X.; YUAN, Y-J.; WU, J-C. Synthesis and evaluation of water-soluble paclitaxel prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 3301-3303, 2002.

FERREIRA, D. S.; LOPES, S. C. A.; FRANCO, M. S.; OLIVEIRA, M. C. pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Therapeutic Delivery*, v. 4, p. 1099-1123, 2013.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, p. 511-518, 2005.

GABIZON, A.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, p. 6949-6953, 1988.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; HOROWITZ, A. T.; ZALIPSKY, S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1177-1192, 2004.

GARIN-CHESA, P.; CAMPBELL, I.; SAIGO, P. E.; JR-LEWIS, J. L.; OLD, L. J.; RETTIG, W. Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26: sensitive and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein. *American Journal of Pathology*, v. 142, n. 2, p. 557-567, 1993.

GELDERBLUM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, v. 37, p. 1590-1598, 2001.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters*, v. 14, p. 95-99, 1971.

GU, Q.; XING, J. Z.; HUANG, M.; ZHANG, X.; CHEN, J. Nanoformulation of paclitaxel to enhance cancer therapy. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 28, p. 298-307, 2012.

GUCHELAAR, H. J.; TEN NAPEL, C. H. H.; DE VRIES, E. G. E.; MULDER, N. H. Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review. *Clinical Oncology*, v. 6, p. 40-48, 1994.

GULATI, M.; GROVE, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 165, p. 129-168, 1998.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HASHIZAKI, K.; TAGUCHI, H.; ITOH, C.; SAKAI, H.; ABE, M.; SAITO, Y.; OGAWA, N. Effects of poly(ethylene glycol) (PEG) chain length of PEG-lipid on the permeability of liposomal bilayer membranes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, p. 815-820, 2003.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron systems via optical methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 125-129, 1998.

HENEY, M.; ALIPOUR, M.; VERGIDIS, D.; OMRI, A.; MUGABE, C.; TH'HG, J.; SUNTRES, Z. Effectiveness of liposomal paclitaxel against MCF-7 breast cancer cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 88, p. 1172-1180, 2010.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – A review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, p. 255-264, 2013a.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – A review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, p. 265-273, 2013b.

HUANG, X.; SONG, G. Y.; YU, S. J.; KIM, I. Water-soluble paclitaxel by conjugation to hyperbranched polyglycidols. *Journal of Materials Science*, v. 48, p. 5163-5170, 2013.

HUIZING, M. T.; SPARREBOOM, A.; ROSING, H.; TELLINGEN, O.; PINEDO, H. M.; BEIJNEN, J. H. Quantification of paclitaxel metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 674, p. 261-268, 1995.

HUREAUX, J.; LAGARCE, F.; GAGNADOUX, F.; ROUSSELET, M-C.; MOAL, V.; URBAN, T.; BENOIT, J-P. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after *i.v.* administration in mice. *Pharmaceutical Research*, v. 27, p. 421-430, 2010.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Validation of analytical procedures: methodology. Geneva: ICH Secretariat, 2005, p. 1-13.

IMMORDINO, M. L.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; STELLA, B.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel. *Journal of Controlled Release*, v. 91, p. 417-429, 2003.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, p. 297-315, 2006.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde. Estimativa do Câncer 2014: Incidência do Câncer no Brasil. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf> >. Acesso em 25 de Fevereiro de 2014.

INGEBRIGTSEN, L.; BRANDL, M. Determination of the size distribution of liposomes by SEC fractionation, and PSC analysis and enzymatic assay of lipid content. *AAPS PharmSciTech*, v. 3, p. 1-7, 2002.

IQBAL, J.; SARTI, F.; PERERA, G.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development and in vivo evaluation of an oral drug delivery system for paclitaxel. *Biomaterials*, v. 31, p. 170-175, 2011.

IRIZARRY, L. D.; LUU, T. H.; McKOY, J. M.; SAMARAS, T.; FISHER, M. J.; CARIAS, E. E.; RAISCH, D. W.; CALHOUN, E. A.; BENNETT, C. L. Cremophor EL – containing paclitaxel – induced anaphylaxis: a call to action. *Community Oncology*, v. 6, p. 132-134, 2009.

ISHIDA, T.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Interactions of liposomes with cells *in vitro* and *in vivo*: opsonins and receptors. *Current Drug Metabolism*, v. 2, p. 397-409, 2001.

ISHIDA, T.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Liposome clearance. *Bioscience Reports*, v. 22, p. 197-224, 2002.

ISHIDA, T.; OKADA, Y.; KOBAYASHI, T.; KIWADA, H. Development of pH-sensitive liposomes that efficiently retain encapsulated doxorubicin (DXR) in blood. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, p. 94-100, 2006.

JAIN, V.; SWARNAKAR, N. K.; MISHRA, P. R.; VERMA, A.; KAUL, A.; MISHARA, A. K.; JAIN, N. K. Paclitaxel loaded PEGylated glyceryl monooleate based nanoparticulate carriers in chemotherapy. *Biomaterials*, v. 33, p. 7206-7220, 2012.

JARACZ, S.; CHEN, J.; KUZNETSOVA, L. V.; OJIMA, I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 5043-5054, 2005.

JASS, J.; TJÄNHAGE, T.; PUU, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, v. 79, p. 3135-3163, 2000.

JHAVERI, M. S.; RAIT, A. S.; CHUNG, K-N.; TREPEL, J. B.; CHANG, E. H. Antisense oligonucleotides targeted to the human α folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 3, p. 1505-1512, 2004.

JING, J.; SZARPAK-JANKOWSKA, A.; GUILLOT, R.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; PICART, C.; AUZÉLY-VELTY, R. Cyclodextrin/Paclitaxel complex in biodegradable capsules for breast cancer treatment. *Chemistry of Materials*, v. 25, p. 3867-3873, 2013.

JUN, H. Y.; YIN, H-H.; KIM, S-H.; PARK, S. H.; YOON, K-Y. Visualization of tumor angiogenesis using MR imaging contrast agent Gd-DTPA-anti-VEGF receptor 2 antibody conjugate in a mouse tumor model. *Korean Journal of Radiology*, v.11, p. 449-456, 2010.

KAN, P.; TSAO, C-W.; WANG, A-J.; SU, W-C.; LIANG, H-F. A liposomal formulation able to incorporate a high content of paclitaxel and exert promising anticancer effect. *Journal of Drug Delivery*, v ?, p. 1-9, 2011.

KANNO, T.; YAMADA, T.; IWABUKI, H.; TANAKA, H.; KURODA, S.; TANIZAWA, K.; KAWAI, T. Size distribution measurement of vesicles by atomic force microscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 309, p. 196-199, 2002.

KARANTH, H.; MURTHY, R. S. R. pH-Sensitive liposomes – principle and application in cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, p. 469-483, 2007.

KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. *Clinical Oncology*, v. 16, p. 176-185, 2004.

KIM, J-Y.; KIM, J-K.; PARK, J-S.; BYUN, Y.; KIM, C-K. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials*, v. 30, p. 5751-5756, 2009.

KIM, S-H.; KIM, J-K.; LIM, S-J.; PARK, J-S.; LEE, M-K.; KIM, C-K. Folate-tethered emulsion for the target delivery of retinoids to cancer cell. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 618-625, 2008.

KINGSLEY, J. D.; DOU, H.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H. E.; DESTACHE, C. J. Nanotechnology: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 1, p. 340-350, 2006.

KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V. P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*, v. 268, p. 235-237, 1990.

KLOOVER, J. S.; BAKKER, M. A.; GELDERBLOM, H.; MEEERBEECK, J. P. Fatal outcome of a hypersensitivity reaction to paclitaxel: a critical review of premedication regimens. *British Journal of Cancer*, v. 90, p. 304-305, 2004.

KO, E. M.; LIPPMANN, Q.; WHITNEY, P. C.; ZAMBONI, W.; GEHRIG, P. A. Clinical risk factors of PEGylated liposomal doxorubicin induced palmar plantar erythrodysesthesia in recurrent ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncology*, v 131, p. 683-688, 2013.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 1, p. 193-212, 2005.

KOSHKINA, N. V.; WALDREP, J. C.; ROBERTS, L. E. Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model. *Clinical Cancer Research*, v. 7, p. 3258-3262, 2001.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. *Journal of Controlled Release*, v. 163, p. 322-334, 2012.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK-KNÖTIGOVÁ, P.; MASEK, J.; KORVASOVÁ, Z.; SKRBALOVÁ, M.; PLOCKOVÁ, J.; BARTHELDYOVÁ, E.; TURÁNEK, J. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterization and *in vivo* anticancer effect. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 2309-2319, 2010.

LAPINSKI, M. M.; CASTRO-FORERO, A.; GREINER, A. J.; OFOLI, R. Y.; BLANCHARD, G. J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *American Chemical Society*, v. 23, p. 11677-11683, 2007.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEITE, E. A.; GIUBERTI, C. S.; WAINSTEIN, A. J. A.; WAINSTEIN, A. P. D. L.; COELHO, L. G. V.; LANA, A. M. Q.; SAVASSI-ROCHA, P. R.; OLIVEIRA, M. C. Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. *Life Sciences*, v. 84, p. 641-649, 2009

LEITE, E. A.; LANA, A. M. Q.; CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; COELHO, L. G. V.; OLIVEIRA, M. C. Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 229-39, 2012b.

LEITE, E. A.; SOUZA, C. M.; CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; COELHO, L. G. V.; LANA, A. M. Q.; CASSELI, G. D.; OLIVEIRA, M. C. Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 5259-5269, 2012a.

LIN, X.; DENG, L.; XU, Y.; DONG, A. Thermosensitive *in situ* hydrogel of paclitaxel conjugated poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone). *The Royal Society of Chemistry*, v. 8, p. 3470-3477, 2012.

LIU, Y.; ZHANG, B.; YAN, B. Enabling anticancer therapeutics by nanoparticle carriers: the delivery of paclitaxel. *International Journal of Molecular Science*, v. 12, p. 4395-4413, 2011.

LOPES, S. C. A.; NOVAIS, M. V. M.; TEIXEIRA, C. S.; HONORATO-SAMPAIO, K.; PEREIRA, M. T.; FERREIRA, L. A. M.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, M. C. Preparation, physicochemical characterization, and cell viability evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid. *BioMed Research International*, v. ?, p. 1-7, 2013.

LÓPEZ, O.; CÓCERA, M.; PONS, R.; AMENITSCH, H.; CAELLES, J. L.; CODERCH, L.; MAZA, A. Use of synchrotron radiation SAXS to study the first steps of the interaction between sodium dodecyl sulfate and charged liposomes. *Spectroscopy*, v. 16, p. 343-350, 2002.

LU, Y.; LOW, P. S. Folate-mediated delivery macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 675-693, 2002.

LUO, C.; WANG, Y.; CHEN, Q.; HAN, X.; LIU, X.; SUN, J.; HE, Z. Advances of paclitaxel formulations based on nanosystem delivery technology. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 434-444, 2012.

MALIPATIL, S. M.; DEEPTHI, M.; PATIL, S. K.; JAHAN, K. Second and third order derivative spectrophotometric estimation of nebivolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 13-15, 2011.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potential: Theory of operation. In: Zetasizer theory manual. Inglaterra, 1996, p. 2.1-2,6.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D. C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D. B.; PARK, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 6, p. 271-279, 2003.

MARKOVIC, B.; VLADIMIROV, S.; CUDINA, O.; SAVIC, V.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K. An application of second-order UV-derivative spectrophotometry for study of solvolysis of a novel fluocinolone acetonide ester. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 75, p. 930-935, 2010.

MARTIN, N.; CATALIN, J.; BLACHON, M. F.; DURAND, A. Assay of paclitaxel (Taxol) in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 709, p. 281-288, 1998.

MARTINS, J. D.; NERY, C. G. C.; PIANETTI, G. A.; VIANA-JÚNIOR, N. S.; VIANNA-SOARES, C. D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, p. 63-70, 2007.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, S. Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 271-284, 2000.

MEDINA, O. P.; ZHU, Y.; KAIREMO, K. Targeted liposomal drug delivery in câncer. *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, p. 2981-2989, 2004.

MEIER, R.; HENNING, T. D.; BODDINGTON, S.; TAVRI, S.; ARORA, S.; PIONTEK, G.; RUDELIUS, M.; COROT, C.; DALDRUP-LINK, H. E. Breast cancers: MR imaging of folate-receptor expression with the folate-specific nanoparticle P1133. *Radiology*, v. 255, p. 527-535, 2010.

MERTINS, O. Estudos físico-químicos e estruturas de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana. 2008 189 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MIELE, E.; SPINELLI, G. P.; MIELE, E.; TOMAO, F.; TOMAO, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, v. 4, p. 99-105, 2009.

MIELKE, S.; SPARREBOOM, A.; MROSS, K. Peripheral neuropathy: A persisting challenge in paclitaxel-based regimes. *European Journal of Cancer*, v. 42, p. 24-30, 2006.

MINEMATSU, H.; OTANI, T.; OOHASHI, T.; HIRAI, M.; OIE, K.; IGARASHI, K.; OHTSUKA, A. Development of na active targeting liposome encapsulated with high-density colloidal gold for transmission electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*, v. 60, p. 95-99, 2011.

MITTAL, A.; CHITKARA, D.; KUMAR, N. HPLC method for the determination of carboplatin and paclitaxel with cremophor EL in an amphiphilic polymer matrix. *Journal of Chromatography B*, v. 855, p. 211-219, 2007.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, p. 561-573, 2006.

MOMEKOVA, D.; RANGELOV, S.; YANEV, S.; NIKOLOVA, E.; KONSTANTINOV, S.; ROMBERG, B.; STORM, G.; LAMBOV, N. Long-circulating, pH-sensitive liposome sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 31, p. 308-317, 2007.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polumer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 343-356, 2004.

NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 159-195, 2000.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; BENEDITO, P. D. F.; COTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. Var. *pallenscens* (C.DC.) Yunck. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p. 61-66, 2006.

NAKANO, K.; TOZUKA, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y.; TAKEUCHI, H. A novel method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 203-209, 2008.

NASEDKIN, A.; DAVIDSSON, J.; KUMPUGDEE-VOLLRATH, M. Determination of nanostructure of liposomes containing two model drugs by X-ray scattering from a synchrotron source. *Journal Synchrotron Radiation*, v. 20, p. 721-728, 2013.

NEJATPOUR, M.; BAYAT, Z.; MAHDIZADEH, S. J. Theoretical study of some physicochemical properties of paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3, n. 4, p. 253-256, 2011.

NEW, R. R. C. Liposomes- a practical approach. New York: *Oxford University Press*, 1990, p. 299.

NOVÁKOVÁ, L.; SATÍNSKY, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, p. 352-367, 2008.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2009–2011 a review. *Microchemical Journal*, v. 106, p. 1-16, 2013.

OLIVEIRA, M. C.; ROSILIO, V.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. *Biophysical Chemistry*, v. 84, p. 127-137, 2000.

PANCHAGNULA, R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 172, p. 1-15, 1998.

PARKER, N.; TURK, M. J.; WESTRICK, E.; LEWIS, J. D.; LOW, P. S.; LEAMON, C. P. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry*, v. 338, p. 284-293, 2005.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, p. 105-113, 2003.

PATEL, V.; BALDHA, R.; PATEL, D. Simultaneous determination of atorvastatin calcium and ezetimib by ratio spectra derivative spectrophotometry and reverse phase-high performance liquid chromatography. *Asian Journal of Chemistry*, v. 22, p. 2511-2517, 2010.

PAUWELS, E. K. J.; RIBEIRO, M. J.; STOOT, H. M.; McCREADY, V. R.; BOURGUIGNON, M.; MAZIÈRE, B. FDG accumulation and tumor biology. *Nuclear Medicine & Biology*, v. 25, p. 317-322, 1998.

PERKINS, W. R.; AHMAD, I.; LI, X.; HIRSH, D. J.; MASTERS, G. R.; FECKO, C. J.; LEE, J.; ALI, S.; NGUYEN, J.; SCHUPSKY, J.; HERBERT, C.; JANOFF, A. S.; MAYNHEW, E. Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 200, p. 27-39, 2000.

PICAS, L.; MILHIET, P-E.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J. Atomic force microscopy: A versatile tool probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 165, p. 845-860, 2012.

PUJADE-LAURAIN, E.; WAGNER, U.; AAVALL-LUNDQVIST, E.; GEBSKI, V.; HEYWOOD, M.; VASEY, P. A.; VOLGGER, B.; VERGOTE, I.; PIGNATA, S.; FERRERO, A.; SEHOULI, J.; LORTHOLARY, A.; KRISTENSEN, G.; JACKISCH, C.; JOLY, F.; BROWN, C.; FUR, N. L.; BOIS, A. Pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *Clinical Oncology*, v. 28, p. 3323-3329, 2010.

RANE, S.; PRABHAKAR, B. Influence of liposome composition on paclitaxel entrapment and pH sensitivity of liposomes. *International Journal of PharmaTech Research*, v. 1, p. 914-917, 2009.

RAO, R. N.; MEENA, S.; ROA, A. R. Na overview of the recente developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 349-363, 2005.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

RIVKIN, I.; COHEN, K.; KOFFLER, J.; MELIKHOV, D.; PEER, D.; MARGALIT, R. Paclitaxel-clusters coated with hyaluronan as selective tumor-targeted nanovectors. *Biomaterials*, v. 31, p. 7106-7114, 2010.

ROWINSKY, E. K.; ONETTO, N.; CANETTA, R. M.; ARBUCK, S. G. Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Seminars in Oncology*, v. 19, p. 646-662, 1992.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (Taxol). *The New England Journal of Medicine*, v. 13, p. 1004-1014, 1995.

RUOZI, B.; TOSI, G.; LEO, E.; VANDELLI, M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta*, v. 73, p. 12-22, 2007.

RYU, B-Y.; SOHN, J-S.; HESS, M.; CHOI, S-K.; CHOI, J-K.; JO, B-W. Synthesis and anti-cancer efficacy of rapid hydrolysed water-soluble paclitaxel pro-drugs. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, v. 19, p. 311-324, 2008.

SALVATI, A.; RISTORI, S.; PIETRANGELI, D.; OBERDISSE, J.; CALAMAI, L.; MARTINI, G.; RICCIARDI, G. Insertion of magnesium(II)-octacarboranyl (hexylsulfanyl) porphyrine into liposomes: A physico-chemical study. *Biphasic Chemistry*, v. 131, p. 43-51, 2007.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química Nova*, v. 25, p. 1185-1185, 2002.

SAUL, J. M.; ANNAPRAGADA, A.; NATARAJAN, J. V.; BELLAMKONDA, R. V. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor *in vitro*. *Journal of Controlled Release*, v. 92, p. 49-67, 2003.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *The AAPS Journal*, v. 14, p. 303-315, 2012.

SCRIPTURE, C. D.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. Paclitaxel chemotherapy: from empiricism to a mechanism-based formulation strategy. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 1, p. 107-114, 2005.

SEDDON, J. M. Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1031, p. 1-69, 1990.

SHARMA, A.; STRAUBINGER, R. M. Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 889-896, 1994.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 154, n. 2, p. 123-140, 1997.

SHARMA, U. S.; BALASUBRAMANIAN, S. V.; STRAUBINGER, R. M. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, p. 1223-1230, 1995.

SHIEH, M-F.; CHU, I-M.; LEE, C-H.; KAN, P.; HAU, D-M.; SHIEH, J-J. Liposomal delivery system for taxol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, n. 1, p. 87-90, 1997.

SILVA, S. M. L.; COELHO, L. N.; MALACHIAS, A.; PEREZ, C. A.; PESQUERO, J. L.; MAGALHÃES-PANIAGO, R.; OLIVEIRA, M. C. Study of the structural organizations of cyclodextrin-DNA complex loaded anionic and pH-sensitive liposomes. *Chemical Physics Letters*, v. 506, p. 66-70, 2011.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J. N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; DE LIMA, M. C. P. On the formulations of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 974-956, 2004.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 235, p. 179-192, 2002.

SITTERBERG, J.; ÖZCETIN, A.; EHRHARDT, C.; BAKOWSKY, U. Utilizing atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 74, p. 2-13, 2010.

SOARES, D. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; DOS SANTOS, R. G.; ANDRADE, M. S.; VILELA, J. M. C.; CARDOSO, V. N.; RAMALDES, G. A. Liposomes radiolabeled with ¹⁵⁹Gd-DTPA-BMA: Preparation, physicochemical characterization, release profile and *in vitro* cytotoxic evaluation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, p. 462-469, 2011.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, v. 27, p. 308-312, 2004.

STEVENS, P. J.; LEE, R. J. A folate receptor-targeted emulsion formulation for paclitaxel. *Anticancer Research*, v. 23, p. 4927-4931, 2003.

SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 41, p. 147-162, 2000.

SURENDIRAN, A.; SANDHIYA, S.; PRADHAN, S. C.; ADITHAN, C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian Journal of Medical Research*, v. 130, p. 689-701, 2008.

SURI, S. S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, v. 1, p. 2-16, 2007.

SZEBENI, J.; MUGGIA, F. M.; ALVING, C. R. Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, p. 300-306, 1998.

TAVARES, G. D.; ISHIKAWA, G. M.; MONTEIRO, T. F.; ZANOLINI, C.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; BOU-CHACRA, N. A.; CONSIGLIERI, V. O. Derivative spectrophotometric method for determination of acyclovir in polymeric nanoparticles. *Química Nova*, v. 35, p. 203-206, 2012.

TORAL, M. I.; QUINTANILLA, S.; RICHTER, P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, p. 117-126, 2002.

TORCHILIN, V. P. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p. 131-135, 2011.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 145-160, 2005.

TREDAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 1441-1454, 2007.

TRICKLER, W. J.; NAGAVEKAR, A. A.; DASH, A. K. A novel nanoparticle formulation for sustained paclitaxel delivery. *AASP PhsemSciTech*, v. 9, p. 486-493, 2008.

TURNER, D. C.; GRUNER, S. M. X-ray diffraction reconstruction of the inverted hexagonal (HII) phase in lipid-water systems. *Biochemistry*, v. 31, p. 1340-1355, 1992.

ULRICH, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, v. 22, p. 129-150, 2002.

USP 32. The United States Pharmacopoeia, 32th. Rockville: *The United States Pharmacopoeial Convention*. 2009. 3505 p.

WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, v. 62, p. 90-99, 2010.

WEISS, T. M.; NARAYANAN, T.; WOLF, C.; GRADZIELSKI, M.; PANINE, P.; FINET, S.; HELSBY, W. I. Dynamics of the self-assembly of unilamellar vesicles. *Physical Review Letters*, v. 94, p. 1-4, 2005.

WHO – World Health Organization. 2012. Disponível em < <http://globocan.iarc.fr/> >. Acesso em 28 de novembro de 2013.

WOODBURY, D.; RICHARDSON, E. S.; GRIGG, A. W.; WELLING, R. D.; KNUDSON, B. H. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distribution. *Journal of Liposome Research*, v. 16, p. 57-80, 2006.

WOODLE, M. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, p. 249-265, 1995.

WU, J.; LIU, Q.; LEE, R. J. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 316, p. 148-153, 2006.

XU, Z.; GU, W.; HUANG, J.; DUI, H.; ZHOU, Z.; YANG, Y.; YAN, Z.; LI, Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 288, p. 361-368, 2005.

YANG, T.; CHOI, M-K.; CUI, F-D.; KIM, J. S.; CHUNG, S-J.; SHIM, C-K.; KIM, D-D. Preparation and ecaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. *Journal of Controlled Release*, v. 120, p. 169-177, 2007b.

YANG, T.; CUI, F-D.; CHOI, M-K.; CHO, J-W.; CHUNG, S-J.; SHIM, C-K.; KIM, D-D. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 317-326, 2007a.

YOO, H. S.; PARK, T. G. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *Journal of Controlled Release*, v. 100, p. 247-256, 2004.

YOSHIZAWA, Y.; KONO, Y.; OGAWARA, K-I.; KIMURA, T.; HIGAKI, K. PEG liposomalization of paclitaxel improved its *in vivo* disposition and anti-tumor efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 412, p. 132-141, 2011.

YU, S.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHEN, X.; ZHANG, Z.; WU, W.; JIANG, X. Synthesis of paclitaxel-conjugated β -cyclodextrin polyrotaxane and its antitumor activity. *Polyrotaxanes*, v. 52, p. 7272-7277, 2013.

ZHANG, D.; YANG, R.; WANG, S.; DONG, Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 279-284, 2014.

ZHANG, J. Q.; ZHANG, Z. R.; YANG, H.; TAN, Q. Y.; QIN, S. R.; QIU, X. L. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharmaceutical Research*, v. 22, p. 573-583, 2005.

ZHANG, W.; SHI, Y.; HAO, J.; SHA, X.; FANG, X. The potential of pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. *Biomaterials*, v. 31, p. 5943-5944, 2011.

ZHAO, L.; FENG, S-S. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 285, p. 326-335, 2005.

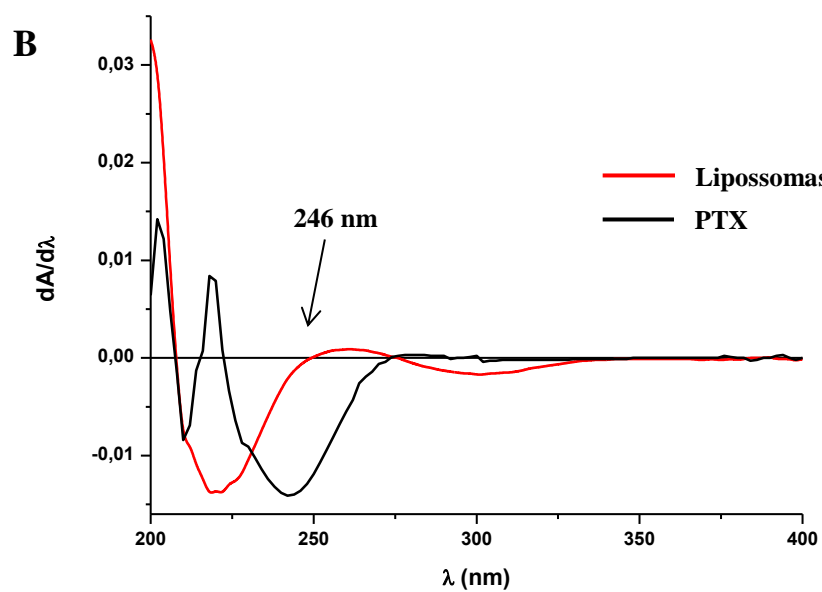
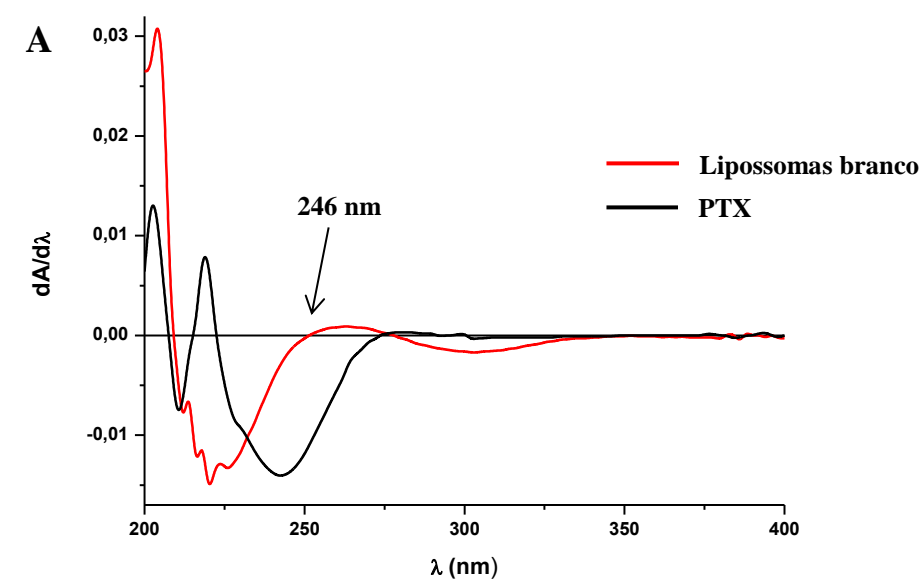
ZHAO, P.; WANG, H.; YU, M.; LIAO, Z.; WANG, X.; ZHANG, F.; JI, W.; WU, B.; HAN, J.; ZHANG, H.; WANG, H.; CHANG, J.; NIU, R. Paclitaxel loaded folic targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 81, p. 248-256, 2012.

ZWICKE, G. L.; MANSOORI, G. A.; JEFFERY, C. J. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Reviews*, v. 3, p. 184-196, 2012.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Espectros de absorção de primeira derivado obtido para uma solução de PTX, lipossomas brancos contendo SPC e lipossomas branco contendo DSPE-PEG-folato



Espectros de absorção de primeira derivada obtidos para uma solução do PTX 15 $\mu\text{g/mL}$ e dos lipossomas brancos compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG:DSPE-PEG-folato (A) e SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG (B) em metanol, utilizando $\Delta\lambda = 2$ nm e fator de escala 1. A seta com o comprimento de onda indica o ponto de anulação para os componentes dos lipossomas.

Anexo B – Produção Científica Associada a essa Dissertação

Trabalhos Completos Publicados em Eventos Internacionais

1. BARBOSA, M. V.; MONTEIRO, L.; VILELA, J. M.; ANDRADE, M.; GIUBERTI, C.; OLIVEIRA, M.; CARVALHO-JÚNIOR, A.; LEITE, E. Influence of the composition on the physicochemical and morphological characterization of the liposomal lipid system containing paclitaxel. In: *9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Lisboa, Portugal, 2014.

Resumos Apresentados em Eventos Nacionais

1. MONTEIRO, L. O. F.; BARBOSA, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; LEITE, E. A. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistema lipídico lipossomal contendo paclitaxel. In: *II SEMINÁRIO REDE NANOFITO/CAPES – Rede de biotecnologia visando à formação de recursos qualificados para o desenvolvimento e inovação de produtos nanoestruturados lipídicos aplicados à saúde*. Florianópolis, Santa Catarina. Anais do II Seminário rede NANOFITO, v. 1, p. 43, 2013
2. BARBOSA, M. V.; MONTEIRO, L. O. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; OLIVEIRA, M. C.; LEITE, E. A. Stability studies and morphological analysis of a liposomal lipid system containing paclitaxel. In: *Symposium on nanotechnology and its applications in health*. Belo Horizonte, Minas Gerais. Anais do Simpósio NANOBIOIMG, v. 1, p. 25, 2013.

3. MONTEIRO, L. O. F.; BARBOSA, M. V.; GOMES, N. K. M.; CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; OLIVEIRA, M. C.; LEITE, E. A. Development of a liposomal lipid system containing paclitaxel: composition influence on the physicochemical characterization. In: *Symposium on nanotechnology and its applications in health*. Belo Horizonte, Minas Gerais. Anais do Simpósio NANOBIOMG, v. 1, p. 24, 2013.
4. BARBOSA, M. V.; MALAGUTTI, A. R.; OLIVEIRA, M. C.; LEITE, E. A. Desenvolvimento e validação de um método analítico espectrofotométrico para a determinação do paclitaxel em uma formulação lipossomal. In: *XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química*. Ouro Preto, Minas Gerais, 2012.

